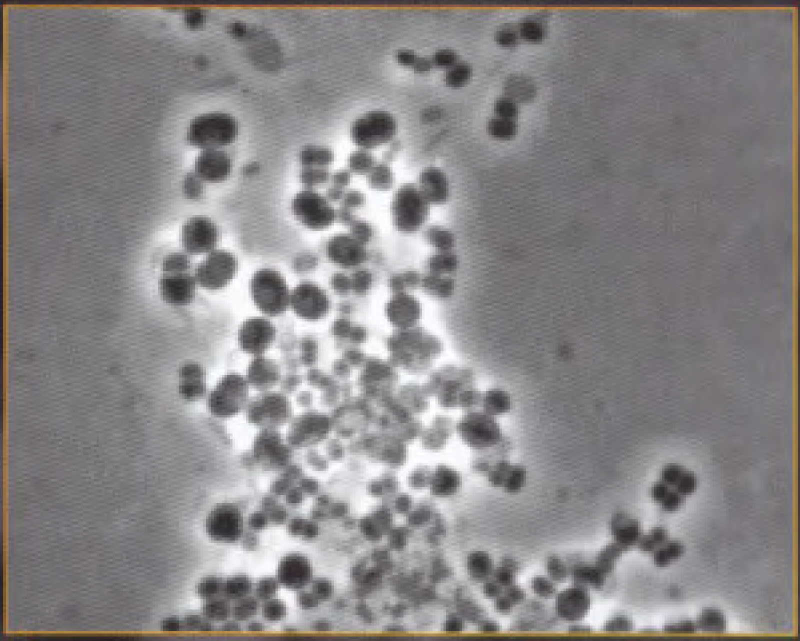
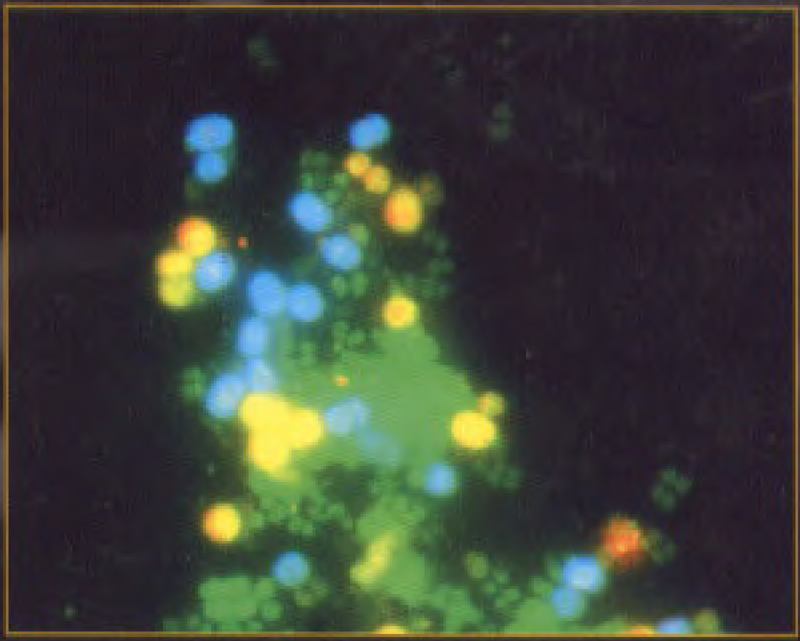
10ª Edición

Brock
Biología de los Microorganismos





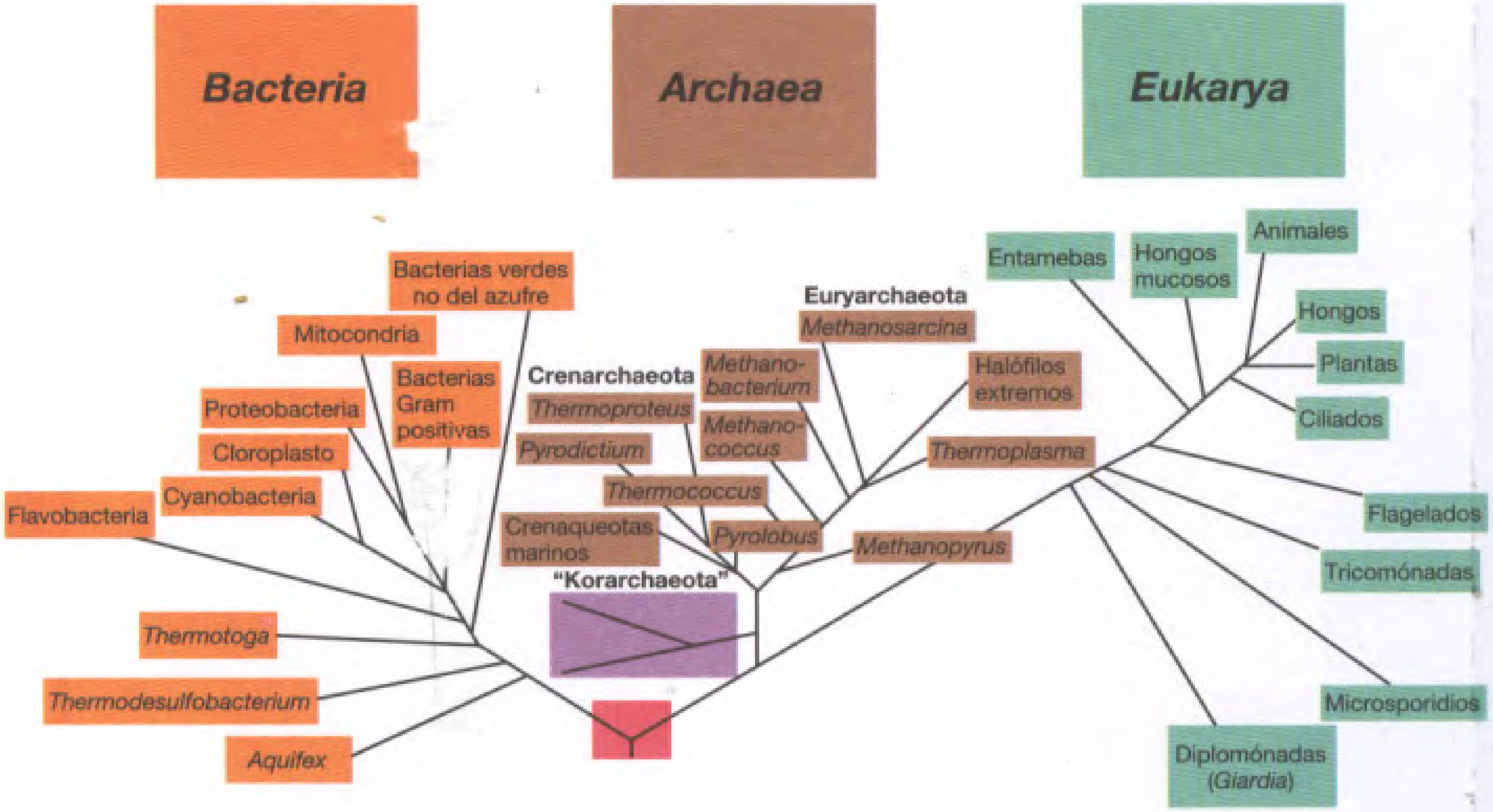
Michael T. Madigan
John M. Martinko
Jack Parker

PEARSON
Prentice Hall

VISIT…

LANZAROTE
Caliente.COM

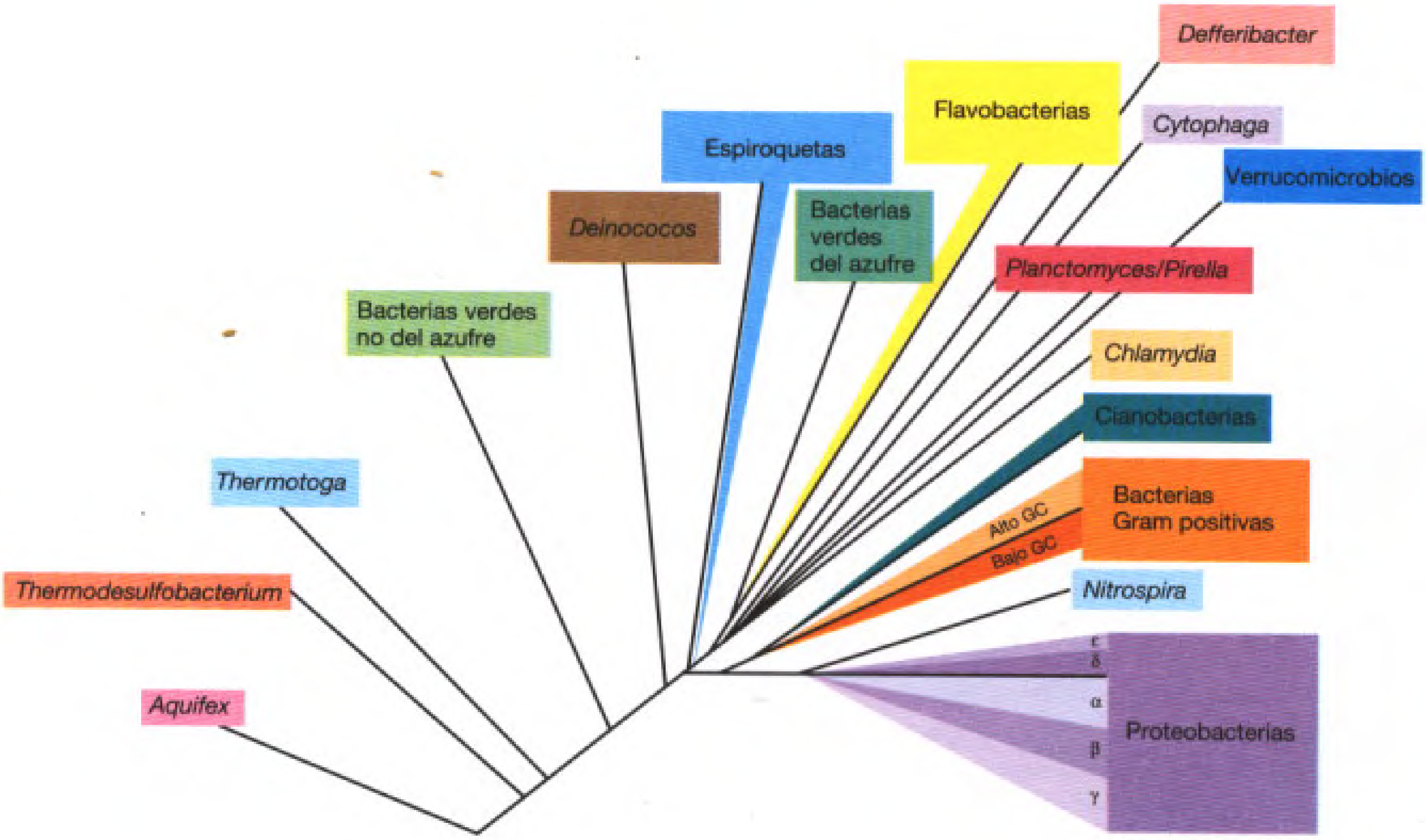
FILOGENIA DE LOS SERES VIVOS-VISIÓN GLOBAL


Bacteria
Archaea
Eukarya
Bacterias verdes no del azufre
Mitocondria
Bacterias Gram positivas
Proteobacteria
Cloroplasto
Cyanobacteria
Flavobacteria
Thermotoga
Thermodesulfobacterium
Aquifex
Crenarchaeota
Thermoproteus
Pyrodictium
Thermococcus
Crenaqueotas marinos
Pyrolobus
"Korarchaeota"
Euryarchaeota
Methanosarcina
Methanobacterium
Methanococcus
Halófilos extremos
Thermoplasma
Methanopyrus
Entamebas
Hongos mucosos
Animales
Hongos
Plantas
Ciliados
Flagelados
Tricomónadas
Microsporidios
Diplomónadas (Giardia)

ÁRBOL FILOGENÉTICO UNIVERSAL. Este árbol se ha construido a partir de la comparación de las secuencias de los RNA ribosómicos 16S y 18S. Observe los tres dominios de seres vivos: *Bacteria*, *Archaea*, y *Eukarya*. La distancia evolutiva entre dos grupos de organismos es proporcional a la suma de las distancias desde el final de las ramas hasta el punto donde se unen los dos grupos. *Véanse* Secciones 11.4-11.8 para más información sobre filogenias basadas en RNA ribosómico. *Datos obtenidos de la Base de Datos del Proyecto de Secuenciación del Ribosoma (Ribosomal Database project).* **http://rdp.cme.msu.edu**

FILOGENIA DE LOS SERES VIVOS-*BACTERIA*

UNIVERSIDAD DE TALCA
BIBLIOTECA CENTRAL
3 5604 00103297 6


Defferibacter
Flavobacterias
Cytophaga
Espiroquetas
Verrucomicrobios
Deinococos
Bacterias verdes del azufre
Planctomyces/Pirella
Bacterias verdes no del azufre
Chlamydia
Cianobacterias
Thermotoga
Alto GC
Bajo GC
Bacterias Gram positivas
Thermodesulfobacterium
Nitrospira
Aquifex
ε
δ
α
β
γ
Proteobacterias

ÁRBOL FILOGENÉTICO DE *BACTERIA*. Este árbol se ha construido a partir de las secuencias del RNA ribosómico 16S. Al menos 17 grupos principales de *Bacteria* pueden definirse, como se indica. *Véanse* Secciones 11.4-11.8 para más información sobre filogenias basadas en RNA ribosómico. *Datos obtenidos de la Base de Datos del Proyecto de Secuenciación del Ribosoma (Ribosomal Database project).* **http://rdp.cme.msu.edu**

Décima edición

BROCK

BC-CG
576
B864b.E 10a. ed
c. 18
97668
10 ed.

BIOLOGÍA DE LOS MICROORGANISMOS

Michael T. Madigan
John M. Martinko
Jack Parker
Southern Illinois University Carbondale

UNIVERSIDAD DE TALCA
BIBLIOTECA CENTRAL

TRADUCCIÓN

Mariano Gacto Fernández
Universidad de Murcia

Tomás González Villa
Universidad de Santiago

Ricardo Guerrero Moreno
Universidad de Barcelona

Javier Jiménez Jiménez
Universidad de Salamanca

Germán Larriba Calle
Universidad de Extremadura

Carmina Rodríguez Fernández
Universidad Complutense de Madrid

Miguel Sánchez Pérez
Universidad de Salamanca

REVISIÓN TÉCNICA

Carmina Rodríguez Fernández
Universidad Complutense de Madrid

Miguel Sánchez Pérez
Universidad de Salamanca

La editorial desea agradecer la colaboración en la traducción de
Nuria Bueno del Romo

PEARSON
Prentice Hall

Madrid • México • Santafé de Bogotá • Buenos Aires • Caracas • Lima
Montevideo • San Juan • San José • Santiago • São Paulo • White Plains

Resumen del contenido

Unidad I PRINCIPIOS DE LA MICROBIOLOGÍA

Capítulo 1 Microorganismos y microbiología 1
Capítulo 2 Perspectiva general de la vida microbiana 21
Capítulo 3 Macromoleculas 38
Capítulo 4 Estructura y función celular 55
Capítulo 5 Nutrición, cultivo y metabolismo microbiano 102
Capítulo 6 Crecimiento microbiano 137
Capítulo 7 Principios de biología molecular microbiana 167
Capítulo 8 Regulación de la expresión génica 206
Capítulo 9 Virología básica 231
Capítulo 10 Genética bacteriana 264

Unidad II EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOLOGÍA Y DIVERSIDAD MICROBIANA

Capítulo 11 Evolución microbiana y sistemática 321
Capítulo 12 La diversidad procariótica: *bacteria* 351
Capítulo 13 La diversidad procariótica: *archaea* 441
Capítulo 14 Biología de la célula eucariótica y microorganismos eucarióticos 468
Capítulo 15 Genómica microbiana 493
Capítulo 16 Virus de bacterias, plantas y animales 512

Unidad III DIVERSIDAD METABÓLICA Y ECOLOGÍA MICROBIANA

Capítulo 17 Diversidad metabólica 593
Capítulo 18 Métodos de ecología microbiana 606
Capítulo 19 Hábitat microbianos, ciclos de nutrientes e interacciones con plantas y animales 624

Unidad IV INMUNOLOGÍA, PATOGENIA Y RESPUESTAS DEL HOSPEDADOR

Capítulo 20 Control del crecimiento microbiano 687
Capítulo 21 Relaciones hospedador-parásito en humanos 719
Capítulo 22 Inmunología esencial 747
Capítulo 23 Inmunología molecular 779
Capítulo 24 Microbiología e inmunología clínica 796

Unidad V INFECCIONES MICROBIANAS

Capítulo 25 Epidemiología 838
Capítulo 26 Enfermedades microbianas transmitidas de persona a persona 867
Capítulo 27 Enfermedades transmitidas por animales, por artrópodos y por microorganismos del suelo 905
Capítulo 28 Tratamiento de aguas residuales, potabilización de aguas y enfermedades microbianas transmitidas por el agua 926
Capítulo 29 Conservación de los alimentos y enfermedades microbianas transmitidas por alimentos 942

Unidad VI LOS MICROORGANISMOS COMO HERRAMIENTAS EN LA INDUSTRIA Y EN LA INVESTIGACIÓN

Capítulo 30 Microbiología industrila y biocatálisis 957
Capítulo 31 Ingeniería genética y biotecnología 986

Décima edición visión general

BROCK BIOLOGÍA DE LOS MICROORGANISMOS

Nueva organización

La décima edición se ha reorganizado completamente en seis unidades que agrupan los capítulos bajo un tema principal, lo que le permite relacionar fácilmente la información temática con los materiales centrales y los propósitos del curso. Esta edición también incluye siete capítulos nuevos.

¡NUEVO! La Unidad I constituye la parte central del curso de microbiología general como prevee la División de Educación de la Sociedad Americana de Microbiología (ASM).

I. PRINCIPIOS DE LA MICROBIOLOGÍA

1. Microorganismos y microbiología
2. Perspectiva general de la vida microbiana
3. Macromoleculas
4. Estructura y función celular
5. Nutrición, cultivo y metabolismo microbiano
6. Crecimiento microbiano
7. Principios de biología molecular microbiana
8. Regulación de la expresión génica
9. Virología básica
10. Genética bacteriana

¡NUEVO! El Capítulo 2 proporciona una **visión inicial de la diversidad microbiana.**

El Capítulo 9 hace hincapié en los **conceptos centrales de la virología**. (El Capítulo 16 trata la diversidad vírica con más detalle).

El Capítulo 10 se volvió a redactar para plasmar mejor **la genética bacteriana tal como se practica en la actualidad**, una mezcla de ciencia *in vivo* e *in vitro*.

II. EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOLOGÍA Y DIVERSIDAD MICROBIANA

11. Evolución microbiana y sistemática
12. La diversidad procariótica: *bacteria*
13. La diversidad procariótica: *archaea*
14. Biología de la célula eucariótica y microorganismos eucarióticos
15. Genómica microbiana
16. Virus de bacterias, plantas y animales

¡NUEVO! El Capítulo 15 cubre los aspectos esenciales de los **proyectos de genómica microbiana**, de bacterias a levaduras.

¡NUEVO! El Capítulo 16 permite a los profesores escoger fácilmente aquellos **ejemplos de virus** que deseen como complemento de los aspectos fundamentales de la materia del Capítulo 9.

III. DIVERSIDAD METABÓLICA Y ECOLOGÍA MICROBIANA

17. Diversidad metabólica
18. Métodos de ecología microbiana
19. Hábitat microbianos, ciclos de nutrientes e interacciones con plantas y animales

¡NUEVO! El Capítulo 18 trata sobre todo de los **métodos**.

El Capítulo 19 cubre los **hábitat y la ecología microbiana** sin incluir información sobre los métodos.

IV. INMUNOLOGÍA, PATOGENIA Y RESPUESTAS DEL HOSPEDADOR

20. Control del crecimiento microbiano
21. Relaciones hospedador-parásito en humanos
22. Inmunología esencial
23. Inmunología molecular
24. Microbiología e inmunología clínica

¡NUEVO! **Dos nuevos capítulos sobre inmunología:** el Capítulo 22 cubre los aspectos fundamentales y el Capítulo 23 trata los detalles moleculares.

El Capítulo 24 incluye una mayor información sobre los **inmunoensayos**.

V. INFECCIONES MICROBIANAS

25. Epidemiología
26. Enfermedades microbianas transmitidas de persona a persona
27. Enfermedades transmitidas por animales, por artrópodos y por microorganismos del suelo
28. Tratamiento de aguas residuales, potabilización de aguas y enfermedades microbianas transmitidas por el agua
29. Conservación de los alimentos y enfermedades microbianas transmitidas por alimentos

Las **enfermedades** se tratan ahora en cinco capítulos en lugar de en dos.

¡NUEVO! Tres nuevos capítulos en estos importantes temas en microbiología.

VI. LOS MICROORGANISMOS COMO HERRAMIENTAS EN LA INDUSTRIA Y EN LA INVESTIGACIÓN

30. Microbiología Industrial y Biocatálisis
31. Ingeniería genética y biotecnología

Los capítulos 30 y 31 se han agrupado en su propia unidad, lo que refleja mejor sus fines comunes y distingue entre sus métodos de producción industrial.

Los números de la Sección asociados a la numeración de las páginas constituyen puntos fáciles de referencia.

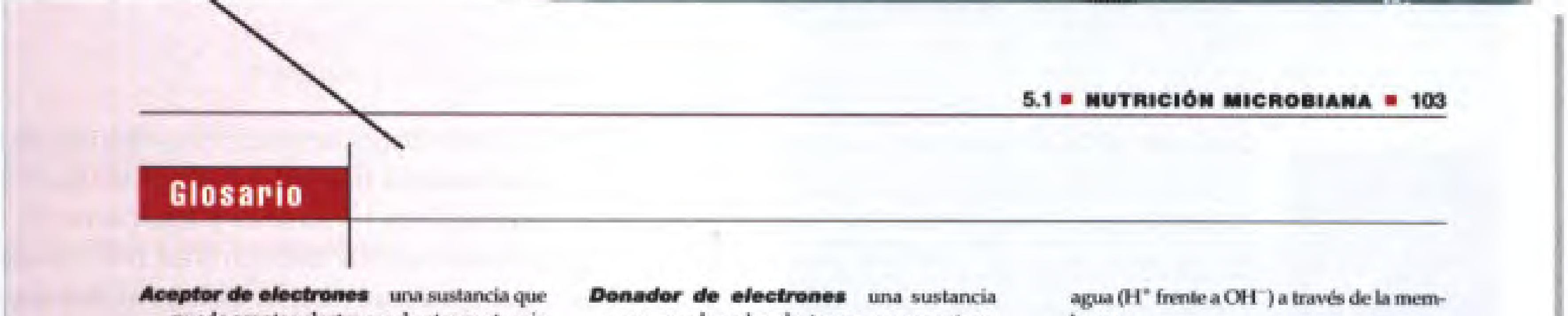
Nuevos «epígrafes» que organizan el contenido de los capíulos con mayor eficacia.

El glosario guía al estudiante por el lenguaje de la microbiología.

NUTRICIÓN, CULTIVO Y METABOLISMO MICROBIANO 5

I	NUTRICIÓN Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS	103
5.1	Nutrición microbiana	103
5.2	Medios de cultivo	107
5.3	Cultivo de microorganismos en el laboratorio	108
II	ENERGÍA Y ENZIMAS	110
5.4	Bioenergética	110
5.5	Catálisis y enzimas	111
III	OXIDACIÓN-REDUCCIÓN Y COMPUESTOS DE ALTA ENERGÍA	113
5.6	Oxidación-reducción	114
5.7	El NAD como un transportador redox de electrones	116
5.8	Compuestos de alta energía y almacenamiento de energía	118
IV	PRINCIPALES RUTAS CATABÓLICAS, TRANSPORTE DE ELECTRONES Y FUERZA MOTRIZ DE PROTONES	119
5.9	Conservación de la energía: opciones	119
5.10	La glucolisis como ejemplo de fermentación	120
5.11	Respiración y transportadores de electrones asociados a membranas	122
5.12	Conservación de la energía a partir de la fuerza motriz de protones	125
5.13	Flujo del carbono en la respiración: el ciclo del ácido cítrico	128
V	DIVERSIDAD CATABÓLICA Y VISIÓN GLOBAL DE LA BIOSÍNTESIS	
5.14	Alternativas catabólicas	
5.15	Biosíntesis de monó	

102



5.1 ▪ NUTRICIÓN MICROBIANA ▪ 103

Glosario

Aceptor de electrones una sustancia que puede aceptar electrones de otra sustancia y que se reduce durante el proceso

Aerobio un microorganismo capaz de usar O_2 en la respiración

Anabolismo la suma total de todas las reacciones biosintéticas de la célula

Anaerobio un microorganismo que crece en ausencia de O_2

ATP sintetasa (ATPasa) complejo enzimático multiproteico anclado en la membrana que cataliza la síntesis de ATP acoplada a la fuerza motriz de protones

Autótrofo un organismo capaz de biosintetizar todo el material celular a partir del CO_2 como única fuente de carbono

Catabolismo conjunto de reacciones bioquímicas que conducen a la producción de energía utilizable por la célula (normal-

Donador de electrones una sustancia que puede ceder electrones a un aceptor y que se oxida durante el proceso

Endotérmica que requiere energía

Energía de activación es la energía requerida para llevar al sustrato a un estado reactivo

Energía libre energía disponible para la realización de un trabajo (se representa por *G*)

Enzima una proteína que tiene la capacidad de acelerar (catalizar) una reacción química específica

Exotérmica que libera energía

Fermentación catabolismo anaeróbico en el que un compuesto orgánico sirve al mismo tiempo como donador y como aceptor de electrones y en el que el ATP se produce por fosforilación a nivel de sustrato

Fosforilación a nivel de sustrato pro-

agua (H^+ frente a OH^-) a través de la membrana

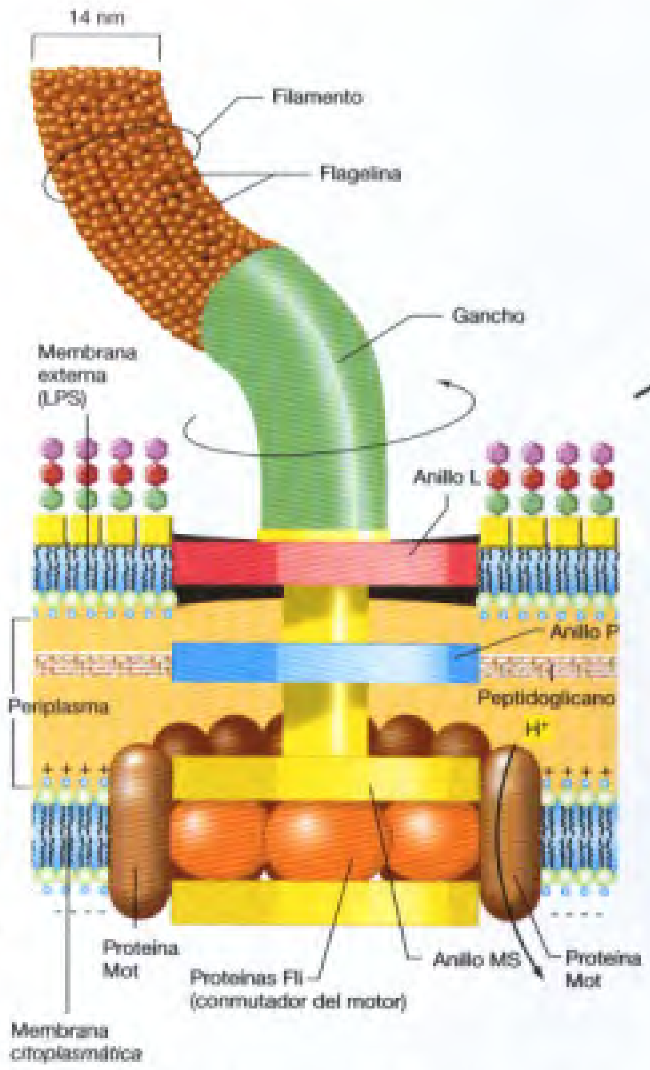
Glicolisis una ruta bioquímica mediante la cual se fermenta la glucosa para producir energía (ATP) y varios productos resultantes de la fermentación. También se denomina ruta de Embden-Meyerhof

Medio complejo un medio de cultivo compuesto por hidrolizados de sustancias químicas no definidas, como extractos de levadura o de carne

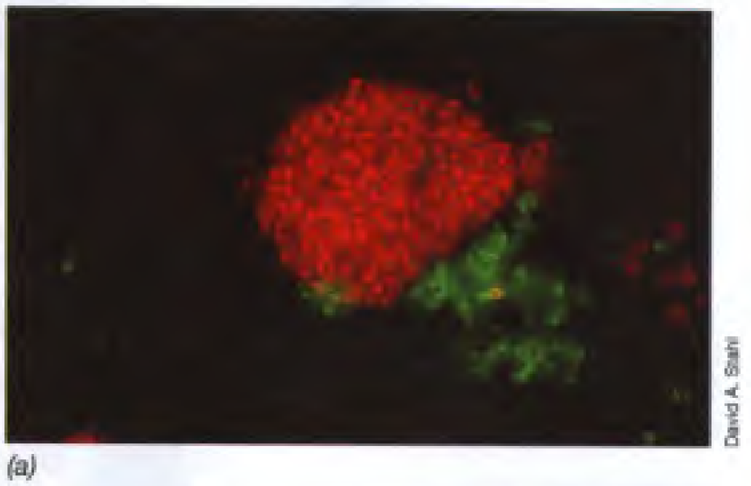
Medio de cultivo una solución acuosa de varios nutrientes que permite el crecimiento de los microorganismos

Medio definido un medio de cultivo del que se conoce su composición química exacta

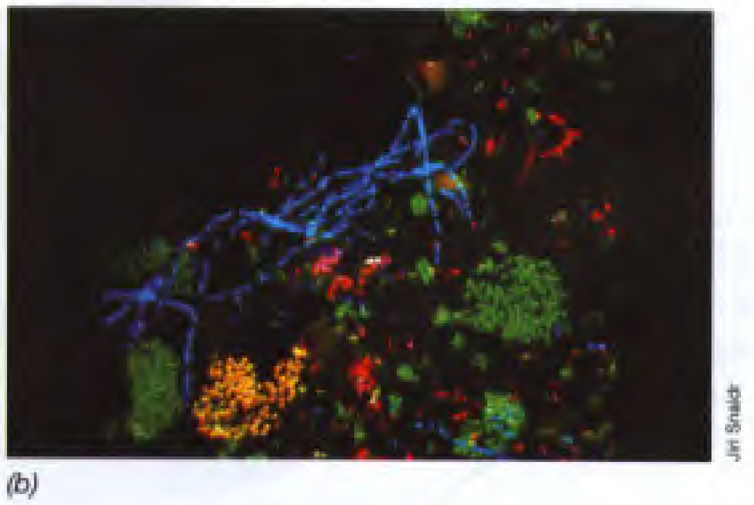
Potencial de reducción la tendencia intrínseca (medida en voltios) de una sus-


14 nm
Filamento
Flagelina
Gancho
Membrana externa (LPS)
Anillo L
Anillo P
Peptidoglicano
H+
Periplasma
Proteína Mot
Proteínas Fli (conmutador del motor)
Anillo MS
Proteína Mot
Membrana citoplasmática

La excepcionales imágenes han sido exhaustivamente revisadas y modificadas para maximizar su impacto y claridad.


(a)

David A. Stahl


(b)

Jiri Snaidr

Extraordinarias micrografías, la mayoría se obtuvieron de los propios investigadores en los distintos campos.

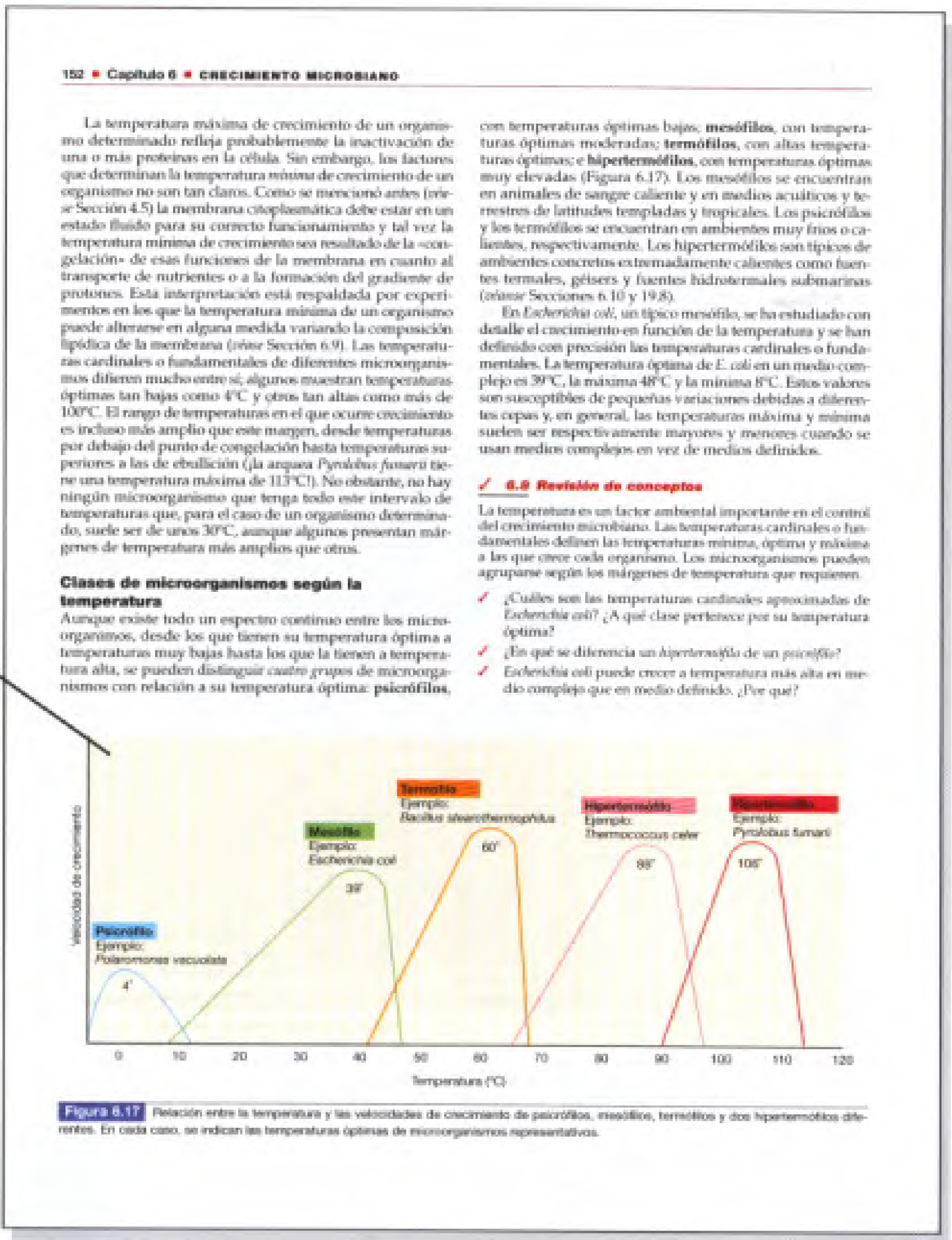
600 • Capítulo 17 • DIVERSIDAD METABÓLICA

Atención a ...

El poder de la diversidad metabólica: una nueva nitrogenasa

Interesantes acotaciones científicas en recuadros insertados en el texto, los recuadros «Técnicas y aplicaciones», describen los métodos en microbiología y su aplicación en la vida real; los recuadros «Aprendiendo del pasado», describen los desarrollos científicos en microbiología y sus implicaciones en la actualidad; los recuadros «Atención a ...», tratan los temas expuestos en el texto más detalladamente.

Los gráficos se han vuelto a diseñar completamente para facilitar la compresión por parte del estudiante.



152 ■ Capítulo 6 ■ CRECIMIENTO MICROBIANO

La temperatura máxima de crecimiento de un organismo determinado refleja probablemente la inactivación de una o más proteínas en la célula. Sin embargo, los factores que determinan la temperatura *mínima* de crecimiento de un organismo no son tan claros. Como se mencionó *antes* (*véase* Sección 4.5) la membrana citoplasmática debe estar en un estado fluido para su correcto funcionamiento y tal vez la temperatura mínima de crecimiento sea resultado de la «congelación» de esas funciones de la membrana en cuanto al transporte de nutrientes o a la formación del gradiente de protones. Esta interpretación está respaldada por experimentos en los que la temperatura mínima de un organismo puede alterarse en alguna medida variando la composición lipídica de la membrana (*véase* Sección 6.9). Las temperaturas cardinales o fundamentales de diferentes microorganismos difieren mucho entre sí; algunos muestran temperaturas óptimas tan bajas como 4°C y otros tan altas como más de 100°C. El rango de temperaturas en el que ocurre crecimiento es incluso más amplio que este margen, desde temperaturas por debajo del punto de congelación hasta temperaturas superiores a las de ebullición (¡la arquea *Pyrolobus fumarii* tiene una temperatura máxima de 113°C!). No obstante, no hay ningún microorganismo que tenga todo este intervalo de temperaturas que, para el caso de un organismo determinado, suele ser de unos 30°C, aunque algunos presentan márgenes de temperatura más amplios que otros.

Clases de microorganismos según la temperatura

Aunque existe todo un espectro continuo entre los microorganismos, desde los que tienen su temperatura óptima a temperaturas muy bajas hasta los que la tienen a temperatura alta, se pueden distinguir *cuatro grupos* de microorganismos con relación a su temperatura óptima: **psicrófilos**, con temperaturas óptimas bajas; **mesófilos**, con temperaturas óptimas moderadas; **termófilos**, con altas temperaturas óptimas; e **hipertermófilos**, con temperaturas óptimas muy elevadas (Figura 6.17). Los mesófilos se encuentran en animales de sangre caliente y en medios acuáticos y terrestres de latitudes templadas y tropicales. Los psicrófilos y los termófilos se encuentran en ambientes muy fríos o calientes, respectivamente. Los hipertermófilos son típicos de ambientes concretos extremadamente calientes como fuentes termales, géisers y fuentes hidrotermales submarinas (*véanse* Secciones 6.10 y 19.8).

En *Escherichia coli*, un típico mesófilo, se ha estudiado con detalle el crecimiento en función de la temperatura y se han definido con precisión las temperaturas cardinales o fundamentales. La temperatura óptima de *E. coli* en un medio complejo es 39°C, la máxima 48°C y la mínima 8°C. Estos valores son susceptibles de pequeñas variaciones debidas a diferentes cepas y, en general, las temperaturas máxima y mínima suelen ser respectivamente mayores y menores cuando se usan medios complejos en vez de medios definidos.

✓ 6.8 Revisión de conceptos

La temperatura es un factor ambiental importante en el control del crecimiento microbiano. Las temperaturas cardinales o fundamentales definen las temperaturas mínima, óptima y máxima a las que crece cada organismo. Los microorganismos pueden agruparse según los márgenes de temperatura que requieren.

- ✓ ¿Cuáles son las temperaturas cardinales aproximadas de *Escherichia coli*? ¿A qué clase pertenece por su temperatura óptima?
- ✓ ¿En qué se diferencia un *hipertermófilo* de un *psicrófilo*?
- ✓ *Escherichia coli* puede crecer a temperatura más alta en medio complejo que en medio definido. ¿Por qué?

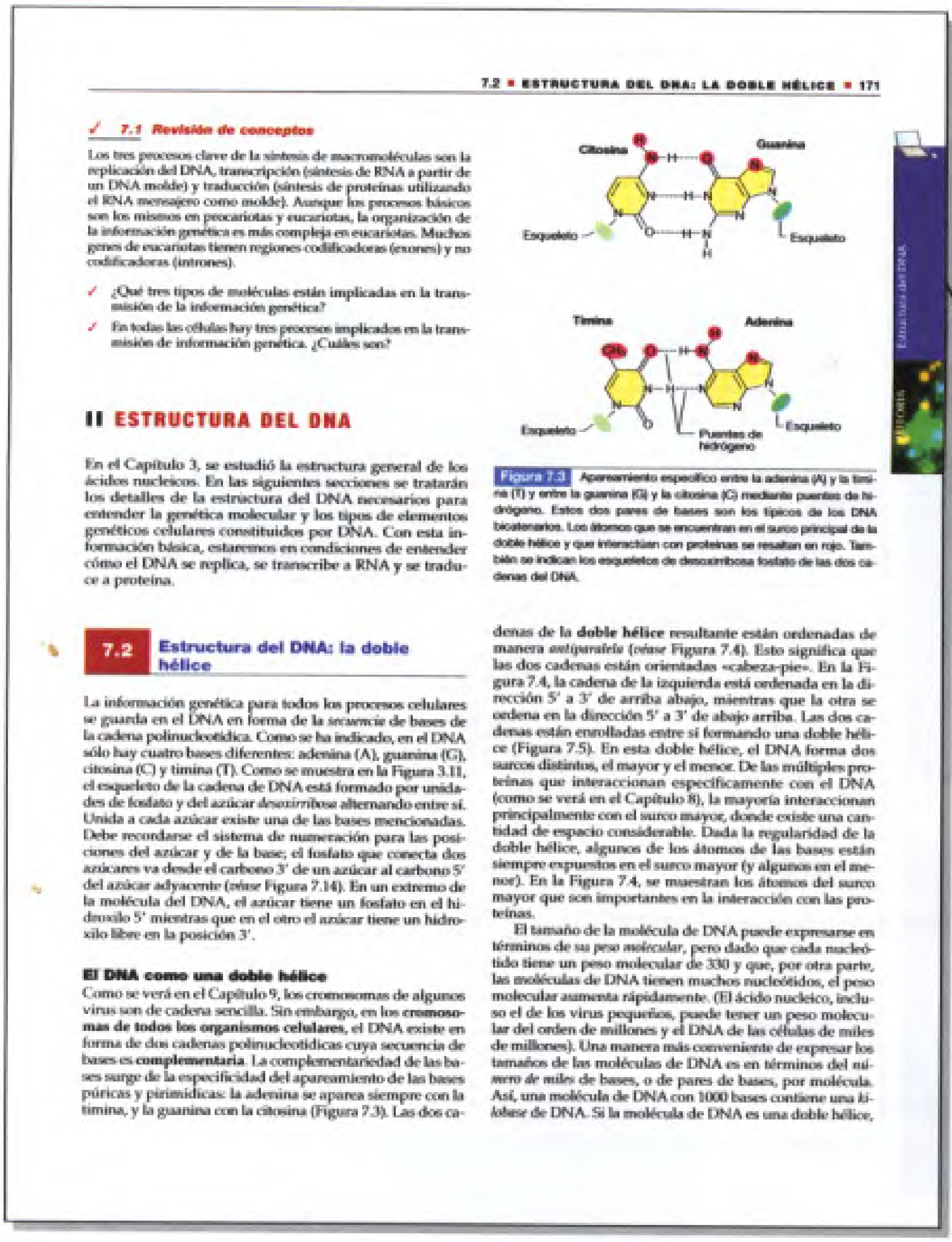
Figura 6.17 Relación entre la temperatura y las velocidades de crecimiento de psicrófilos, mesófilos, termófilos y dos hipertermófilos diferentes. En cada caso, se indican las temperaturas óptimas de microorganismos representativos.

Las «Revisiones de conceptos» resumen cada sección y proponen una serie de preguntas, de modo que los estudiantes pueden evaluar sus conocimientos y la compresión de los mismos a medida que avanzan por el capítulo.

✓ 6.8 Revisión de conceptos

La temperatura es un factor ambiental importante en el control del crecimiento microbiano. Las temperaturas cardinales o fundamentales definen las temperaturas mínima, óptima y máxima a las que crece cada organismo. Los microorganismos pueden agruparse según los márgenes de temperatura que requieren.

- ✓ ¿Cuáles son las temperaturas cardinales aproximadas de *Escherichia coli*? ¿A qué clase pertenece por su temperatura óptima?
- ✓ ¿En qué se diferencia un *hipertermófilo* de un *psicrófilo*?
- ✓ *Escherichia coli* puede crecer a temperatura más alta en medio complejo que en medio definido. ¿Por qué?



7.2 ■ ESTRUCTURA DEL DNA: LA DOBLE HÉLICE ■ 171

✓ 7.1 Revisión de conceptos

Los tres procesos clave de la síntesis de macromoléculas son la replicación del DNA, transcripción (síntesis de RNA a partir de un DNA molde) y traducción (síntesis de proteínas utilizando el RNA mensajero como molde). Aunque los procesos básicos son los mismos en procariotas y eucariotas, la organización de la información genética es más compleja en eucariotas. Muchos genes de eucariotas tienen regiones codificadoras (exones) y no codificadoras (intrones).

- ✓ ¿Qué tres tipos de moléculas están implicadas en la transmisión de la información genética?
- ✓ En todas las células hay tres procesos implicados en la transmisión de información genética. ¿Cuáles son?

II ESTRUCTURA DEL DNA

En el Capítulo 3, se estudió la estructura general de los ácidos nucleicos. En las siguientes secciones se tratarán los detalles de la estructura del DNA necesarios para entender la genética molecular y los tipos de elementos genéticos celulares constituidos por DNA. Con esta información básica, estaremos en condiciones de entender cómo el DNA se replica, se transcribe a RNA y se traduce a proteína.

7.2 Estructura del DNA: la doble hélice

La información genética para todos los procesos celulares se guarda en el DNA en forma de la *secuencia* de bases de la cadena polinucleotídica. Como se ha indicado, en el DNA sólo hay cuatro bases diferentes: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). Como se muestra en la Figura 3.11, el esqueleto de la cadena de DNA está formado por unidades de fosfato y del azúcar *desoxirribosa* alternando entre sí. Unida a cada azúcar existe una de las bases mencionadas. Debe recordarse el sistema de numeración para las posiciones del azúcar y de la base; el fosfato que conecta dos azúcares va desde el carbono 3' de un azúcar al carbono 5' del azúcar adyacente (*véase* Figura 7.14). En un extremo de la molécula del DNA, el azúcar tiene un fosfato en el hidroxilo 5' mientras que en el otro el azúcar tiene un hidroxilo libre en la posición 3'.

El DNA como una doble hélice

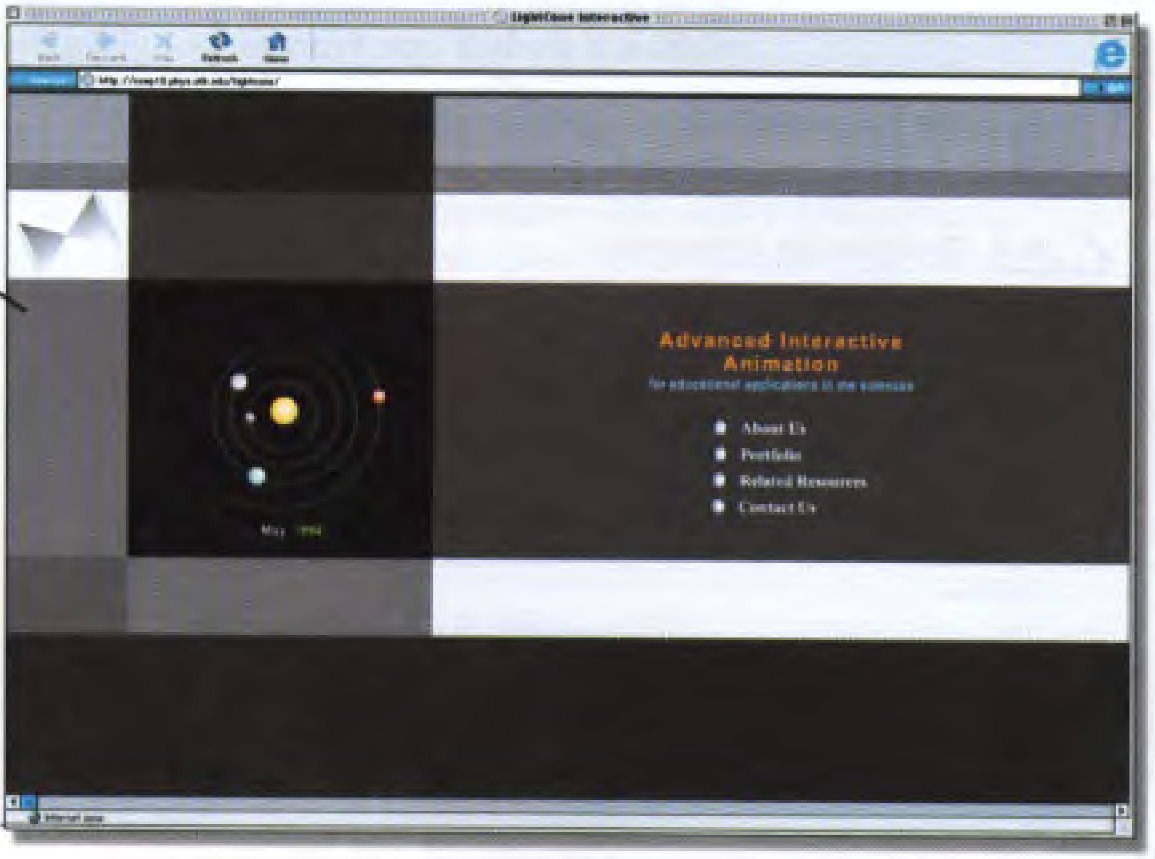
Como se verá en el Capítulo 9, los cromosomas de algunos virus son de cadena sencilla. Sin embargo, en los **cromosomas de todos los organismos celulares**, el DNA existe en forma de dos cadenas polinucleotídicas cuya secuencia de bases es **complementaria**. La complementariedad de las bases surge de la especificidad del apareamiento de las bases púricas y pirimídicas: la adenina se aparea siempre con la timina, y la guanina con la citosina (Figura 7.3). Las dos cadenas de la **doble hélice** resultante están ordenadas de manera *antiparalela* (*véase* Figura 7.4). Esto significa que las dos cadenas están orientadas «cabeza-pie». En la Figura 7.4, la cadena de la izquierda está ordenada en la dirección 5' a 3' de arriba abajo, mientras que la otra se ordena en la dirección 5' a 3' de abajo arriba. Las dos cadenas están enrolladas entre sí formando una doble hélice (Figura 7.5). En esta doble hélice, el DNA forma dos surcos distintos, el mayor y el menor. De las múltiples proteínas que interaccionan específicamente con el DNA (como se verá en el Capítulo 8), la mayoría interaccionan principalmente con el surco mayor, donde existe una cantidad de espacio considerable. Dada la regularidad de la doble hélice, algunos de los átomos de las bases están siempre expuestos en el surco mayor (y algunos en el menor). En la Figura 7.4, se muestran los átomos del surco mayor que son importantes en la interacción con las proteínas.

El tamaño de la molécula de DNA puede expresarse en términos de su *peso molecular*, pero dado que cada nucleótido tiene un peso molecular de 330 y que, por otra parte, las moléculas de DNA tienen muchos nucleótidos, el peso molecular aumenta rápidamente. (El ácido nucleico, incluso el de los virus pequeños, puede tener un peso molecular del orden de millones y el DNA de las células de miles de millones). Una manera más conveniente de expresar los tamaños de las moléculas de DNA es en términos del *número de miles* de bases, o de pares de bases, por molécula. Así, una molécula de DNA con 1000 bases contiene una *kilobase* de DNA. Si la molécula de DNA es una doble hélice,

Figura 7.3 Apareamiento específico entre la adenina (A) y la timina (T) y entre la guanina (G) y la citosina (C) mediante puentes de hidrógeno. Estos dos pares de bases son los típicos de los DNA bicatenarios. Los átomos que se encuentran en el surco principal de la doble hélice y que interactúan con proteínas se resaltan en rojo. También se indican los esqueletos de desoxirribosa fosfato de las dos cadenas del DNA.

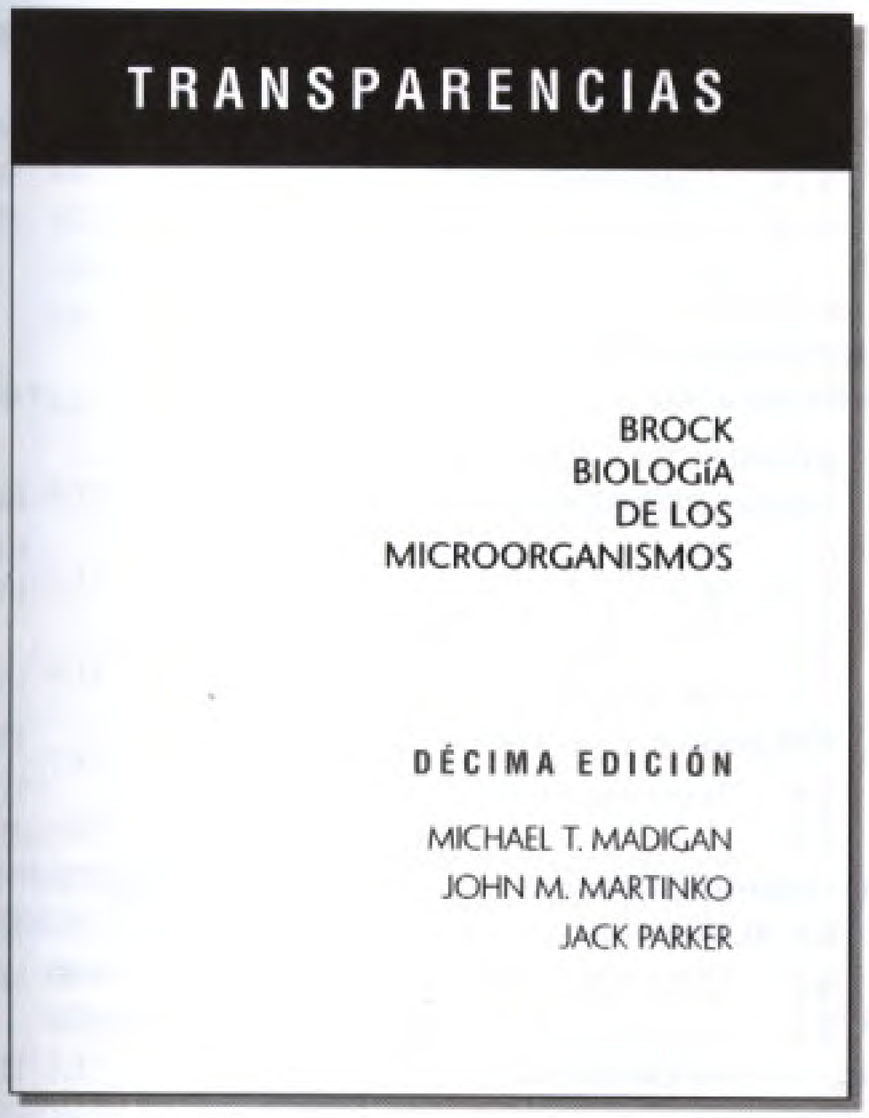
Las «Tutoría», disponibles en la página web asociada, se indican con iconos junto a las figuras clave.

Las «Tutoría», consisten en animaciones, ejercicios interactivos, preguntas de repaso, enlaces a importantes sitios web y mucho más.



Material para el profesor

El CD con recursos educativos para el profesor contendrá presentaciones en PowerPoint, así como un banco de todas las imágenes y la mayoría de las fotografías del texto, junto con un «Manual del profesor» y un «Archivo de pruebas», y una copia del sitio web del estudiante.

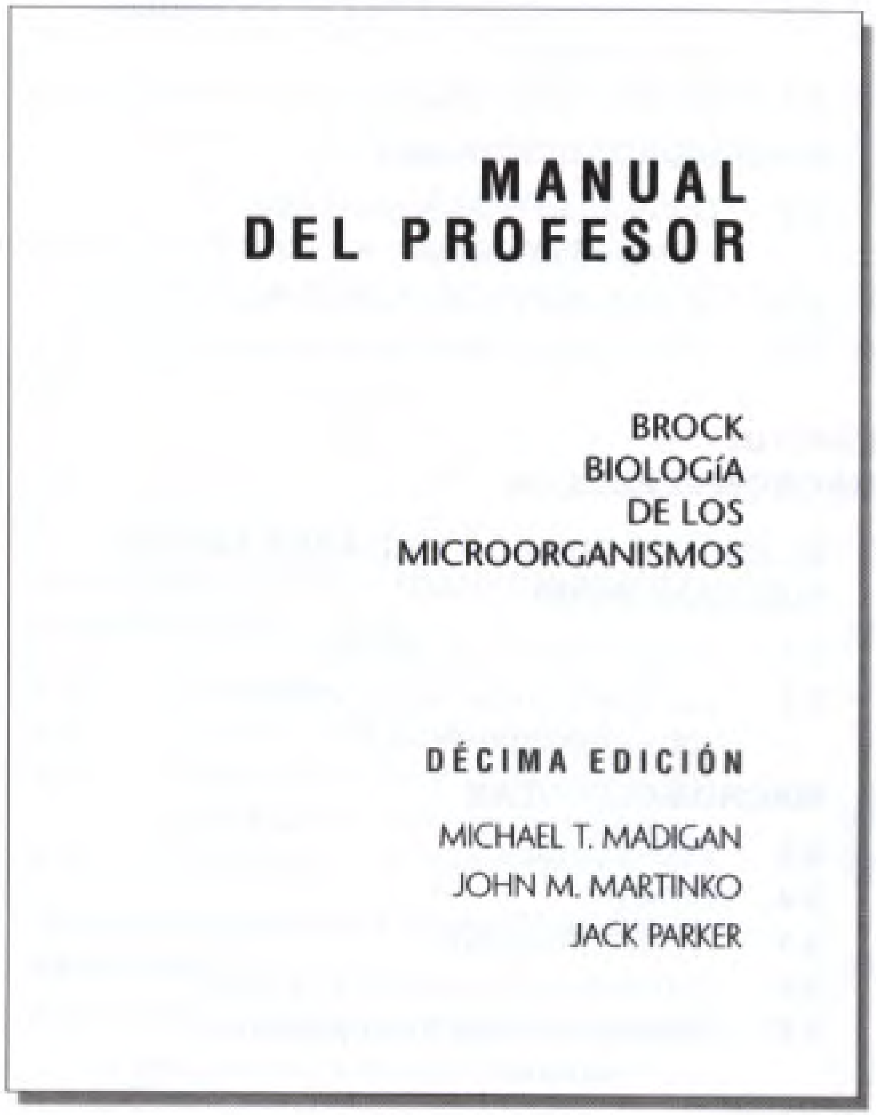


TRANSPARENCIAS

BROCK
BIOLOGÍA
DE LOS
MICROORGANISMOS

DÉCIMA EDICIÓN

MICHAEL T. MADIGAN
JOHN M. MARTINKO
JACK PARKER



MANUAL
DEL PROFESOR

BROCK
BIOLOGÍA
DE LOS
MICROORGANISMOS

DÉCIMA EDICIÓN

MICHAEL T. MADIGAN
JOHN M. MARTINKO
JACK PARKER

Contenido

Prefacio xxi

UNIDAD I PRINCIPIOS DE LA MICROBIOLOGÍA

CAPÍTULO 1
MICROORGANISMOS Y MICROBIOLOGÍA 1

I INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA 1
- **1.1** Microbiología 1
- **1.2** Los microorganismos como células 2
- **1.3** Los microorganismos y sus ambientes naturales 4
- **1.4** El impacto de los microorganismos sobre el hombre 7

II LOS CAMINOS DEL DESCUBRIMIENTO EN MICROBIOLOGÍA 9
- **1.5** Raíces históricas de la microbiología 9
- **1.6** Diversidad microbiana y nacimiento de la microbiología molecular 16

CAPÍTULO 2
PERSPECTIVA GENERAL DE LA VIDA MICROBIANA 21

I ESTRUCTURA CELULAR E HISTORIA EVOLUTIVA 22
- **2.1** Elementos de la estructura celular y vírica 22
- **2.2** Organización del DNA en las células microbianas 24
- **2.3** El árbol de la vida 26

II DIVERSIDAD MICROBIANA 27
- **2.4** Diversidad fisiológica de los microorganismos 28
- **2.5** Diversidad en los procariotas 29
- **2.6** Microorganismos eucarióticos 34

CAPÍTULO 3
MACROMOLECULAS 38

I EL ENLACE QUÍMICO Y EL AGUA EN LOS SISTEMAS VIVOS 39
- **3.1** Enlaces fuertes y débiles 39
- **3.2** Las macromoléculas y el agua como solvente de vida 42

II MACROMOLÉCULAS 43
- **3.3** Polisacáridos 43
- **3.4** Lípidos 45
- **3.5** Ácidos nucleicos 46
- **3.6** Aminoácidos y enlace peptídico 48
- **3.7** Proteínas: estructuras primaria y secundaria 50
- **3.8** Proteínas: estructuras de orden superior y desnaturalización 52

CAPÍTULO 4
ESTRUCTURA Y FUNCIÓN CELULAR 55

I MICROSCOPÍA Y MORFOLOGÍA CELULAR 56
- **4.1** Microscopía óptica 56
- **4.2** Imagen tridimensional: microscopía de contraste de interferencia, fuerza atómica y confocal 60
- **4.3** Microscopía electrónica 62
- **4.4** Morfología celular y la importancia de ser pequeño 63

II MEMBRANAS Y PAREDES CELULARES 66
- **4.5** Estructura de la membrana citoplasmática 66
- **4.6** Función de la membrana citoplasmática 69
- **4.7** Sistemas de transporte de membrana 71
- **4.8** La pared celular de los procariotas: peptidoglicano y moléculas relacionadas 74
- **4.9** La membrana externa de las *Bacteria* Gram negativas 79

III MOVIMIENTO MICROBIANO 82
- **4.10** Flagelos y movilidad 82
- **4.11** Movilidad por deslizamiento 85
- **4.12** Respuestas sensoriales: quimiotaxis, fototaxis y otras taxias 87

IV ESTRUCTURAS DE SUPERFICIE E INCLUSIONES EN PROCARIOTAS 90
- **4.13** Estructuras de la superficie bacteriana e inclusiones celulares 90
- **4.14** Vesículas de gas 94
- **4.15** Endosporas 95

CAPÍTULO 5
NUTRICIÓN, CULTIVO Y METABOLISMO MICROBIANO 102

I NUTRICIÓN Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS 103
- **5.1** Nutrición microbiana 103
- **5.2** Medios de cultivo 107
- **5.3** Cultivo de microorganismos en el laboratorio 108

II ENERGÍA Y ENZIMAS 110
- **5.4** Bioenergética 110
- **5.5** Catálisis y enzimas 111

III OXIDACIÓN-REDUCCIÓN Y COMPUESTOS DE ALTA ENERGÍA 113
- **5.6** Oxidación-reducción 114
- **5.7** El NAD como un transportador redox de electrones 116

5.8 Compuestos de alta energía y almacenamiento de energía 118

IV PRINCIPALES RUTAS CATABÓLICAS, TRANSPORTE DE ELECTRONES Y FUERZA MOTRIZ DE PROTONES 119

5.9 Conservación de la energía: opciones 119
5.10 La glucolisis como ejemplo de fermentación 120
5.11 Respiración y transportadores de electrones asociados a membranas 122
5.12 Conservación de la energía a partir de la fuerza motriz de protones 125
5.13 Flujo del carbono en la respiración: el ciclo del ácido cítrico 129

V DIVERSIDAD CATABÓLICA Y VISIÓN GLOBAL DE LA BIOSÍNTESIS 130

5.14 Alternativas catabólicas 130
5.15 Biosíntesis de monómeros 131

CAPÍTULO 6

CRECIMIENTO MICROBIANO 137

I TEORÍA Y PRÁCTICA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO 138

6.1 Crecimiento celular y fisión binaria 138
6.2 Síntesis del peptidoglicano y división celular 140
6.3 Crecimiento de poblaciones 142
6.4 Curva de crecimiento 144
6.5 Medidas directas del crecimiento microbiano: recuento de células totales y viables 145
6.6 Medidas indirectas del crecimiento microbiano: turbidez 148
6.7 Cultivo continuo: el quimiostato 148

II EFECTOS AMBIENTALES SOBRE EL CRECIMIENTO MICROBIANO 151

6.8 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento 151
6.9 Crecimiento microbiano a bajas temperaturas 153
6.10 Crecimiento microbiano a altas temperaturas 155
6.11 Crecimiento microbiano a pH alto y a pH bajo 158
6.12 Efectos osmóticos sobre el crecimiento microbiano 159
6.13 Oxígeno y crecimiento microbiano 161

CAPÍTULO 7

PRINCIPIOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR MICROBIANA 167

I GENERALIDADES SOBRE GENES Y EXPRESIÓN GÉNICA 168

7.1 Macromoléculas e información genética 169

II ESTRUCTURA DEL DNA 171

7.2 Estructura del DNA: la doble hélice 171
7.3 Estructura del DNA: superenrollamiento 174
7.4 Elementos genéticos 177

III REPLICACIÓN DEL DNA 180

7.5 Replicación del DNA: moldes e iniciadores 180
7.6 Replicación del DNA: la horquilla de replicación 181
7.7 Replicación del DNA: elementos genéticos lineales 185

IV SÍNTESIS Y PROCESAMIENTO DEL RNA 187

7.8 Generalidades sobre la transcripción 187
7.9 Promotores 189
7.10 Terminadores de la transcripción 190
7.11 La unidad de transcripción 191
7.12 Procesamiento del RNA y ribozimas 192

V SÍNTESIS DE PROTEÍNAS 194

7.13 El código genético 194
7.14 RNA de transferencia 197
7.15 Traducción: el proceso de la síntesis de proteínas 200
7.16 Plegamiento y secreción de proteínas 203

CAPÍTULO 8

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA 206

I GENERALIDADES DE LA REGULACIÓN 207

8.1 Principales tipos de regulación 207

II REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA 208

8.2 Inhibición de la actividad enzimática 208
8.3 Modificación de enzimas 210

III REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN: CONTROL POSITIVO Y CONTROL NEGATIVO 211

8.4 Proteínas que se unen al DNA 212
8.5 Control negativo de la transcripción: represión e inducción 215
8.6 Control positivo de la transcripción 217
8.7 Control global y el operón *lac* 218

IV REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN: OTROS MECANISMOS 220

8.8 Atenuación 220
8.9 Otras redes de control global 222
8.10 Transducción de señales y sistemas reguladores de dos componentes 224
8.11 Regulación de la quimiotaxis 226

V PUNTUALIZACIONES FINALES SOBRE LA REGULACIÓN 228

8.12 Diferencias en la expresión génica entre procariotas y eucariotas 229

CAPÍTULO 9
VIROLOGÍA BÁSICA 231
I VIRUS Y VIRIONES 232
9.1 Propiedades generales de los virus 232
9.2 Naturaleza del virión 234
II CRECIMIENTO Y CUANTIFICACIÓN 237
9.3 El hospedador del virus 237
9.4 Cuantificación del virus 238
III REPLICACIÓN VÍRICA 240
9.5 Características generales de la replicación vírica 240
9.6 Etapas en la multiplicación vírica: fijación y penetración 241
9.7 Etapas en la multiplicación vírica: producción de ácido nucleico y proteínas víricas 244
IV DIVERSIDAD VÍRICA 246
9.8 Generalidades de virus de bacterias 246
9.9 Bacteriófagos virulentos: T4 247
9.10 Bacteriófagos atemperados: lambda 250
9.11 Generalidades de los virus de animales 255
9.12 Retrovirus 258
9.13 Viroides y priones 260

CAPÍTULO 10
GENÉTICA BACTERIANA 264
I MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN 265
10.1 Mutaciones y mutantes 266
10.2 Bases moleculares de la mutación 268
10.3 Mutagénesis 271
10.4 Mutagénesis y carcinogénesis: el test de Ames 275
10.5 Recombinación genética 276
II TÉCNICAS DE GENÉTICA BACTERIANA: *IN VIVO* 278
10.6 Transformación genética 278
10.7 Transducción 283
10.8 Plásmidos 286
10.9 Conjugación y movilización del cromosoma 291
10.10 Complementación 296
10.11 Transposones y secuencias de inserción 297
III TECNICAS DE GENÉTICA BACTERIANA: *IN VITRO* 301
10.12 Enzimas de restricción 302
10.13 Secuenciación y síntesis de DNA 305
10.14 Clonación molecular 307
10.15 Los plásmidos como vectores de clonación 308
10.16 El bacteriófago lambda como vector de clonación 310
10.17 Amplificación del DNA: la reacción en cadena de la polimerasa 312
10.18 Mutagénesis *in vitro* y dirigida 314
IV EL CROMOSOMA BACTERIANO 316
10.19 Mapa genético del cromosoma de *Escherichia coli* 316

UNIDAD II EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOLOGÍA Y DIVERSIDAD MICROBIANA

CAPÍTULO 11
EVOLUCIÓN MICROBIANA Y SISTEMÁTICA 321
I LA TIERRA PRIMITIVA, EL ORIGEN DE LA VIDA Y LA DIVERSIFICACIÓN BIOLÓGICA 322
11.1 Evolución de la Tierra y formas primitivas de vida 322
11.2 La vida primitiva: el mundo con RNA, códigos moleculares y producción de energía 325
11.3 Orgánulos y eucariotas: endosimbiosis 328
II RELACIONES EVOLUTIVAS ENTRE LOS MICROORGANISMOS 330
11.4 Cronómetros evolutivos 330
11.5 Secuencias del RNA ribosómico y evolución celular 332
11.6 Secuencias signatura, sondas filogenéticas y análisis de la comunidad microbiana 333
11.7 Filogenia microbiana derivada de secuencias del RNA ribosómico 335
11.8 Características de los dominios de la vida 338
III TAXONOMÍA MICROBIANA Y SU RELACIÓN CON LA FILOGENIA 341
11.9 Taxonomía clásica 341
11.10 Taxonomía molecular 342
11.11 El concepto de especie en microbiología 345
11.12 Nomenclatura y *Manual de Bergey* 348

CAPÍTULO 12
LA DIVERSIDAD PROCARIÓTICA: *BACTERIA* 351
I FILOGENIA BACTERIANA 353
12.1 Generalidades de la filogenia de *Bacteria* 353
II PHYLUM 1: PROTEOBACTERIA 354
12.2 *Bacteria* rojas fototróficas 354
12.3 *Bacteria* nitrificantes 359
12.4 *Bacteria* oxidantes del azufre y del hierro 360
12.5 *Bacteria* oxidantes del hidrógeno 363
12.6 Metanotrofos y metilotrofos 365
12.7 *Pseudomonas* y grupo de las pseudomonas 368
12.8 *Bacteria* del ácido acético 371
12.9 *Bacteria* aeróbicas de vida libre fijadoras de nitrógeno 372

12.10 *Neisseria, Chromobacterium* y géneros relacionados 374
12.11 *Bacteria* entéricas 375
12.12 *Vibrio* y *Photobacterium* 379
12.13 Ricketsias 381
12.14 Espirilos 383
12.15 Proteobacterias con vaina: *Sphaerotilus* y *Leptothrix* 386
12.16 *Bacteria* pedunculadas/con prostecas y que geman 388
12.17 Mixobacterias deslizantes 392
12.18 Proteobacterias reductoras del sulfato y del azufre 395

III PHYLUM 2: *BACTERIA* GRAM POSITIVAS 398
12.19 *Bacteria* Gram positivas no esporuladas, con bajo contenido en GC: *Bacteria* del ácido láctico y géneros relacionados 398
12.20 *Bacteria* Gram positivas esporuladas, con bajo contenido en GC: *Bacillus, Clostridium* y géneros relacionados 403
12.21 *Bacteria* Gram positivas sin pared celular con bajo contenido en GC: los micoplasmas 408
12.22 *Bacteria* Gram positivas con alto contenido en GC: corineformes y *Bacteria* del ácido propiónico 410
12.23 *Bacteria* Gram positivas con alto contenido en GC: *Mycobacterium* 412
12.24 *Bacteria* Gram positivas filamentosas, con alto contenido en GC: *Streptomyces* y otros actinomicetos 414

IV PHYLUM 3: CIANOBACTERIAS Y PROCLOROFITOS 418
12.25 Cianobacterias 418
12.26 Proclorofitos y cloroplastos 422

V PHYLUM 4: CLAMIDIAS 423
12.27 Clamidias 423

VI PHYLUM 5: PLANTOMICES/PIRELLULA 425
12.28 *Plantomyces*: una bacteria pedunculada filogenéticamente única 425

VII PHYLUM 6: VERRUCOMICROBIOS 426
12.29 *Verrucomicrobium* y *Prosthecobacter* 426

VIII PHYLUM 7: FLAVOBACTERIAS 427
12.30 *Bacteroides* y *Flavobacterium* 427

IX PHYLUM 8: GRUPO CYTOPHAGA 428
12.31 *Cytophaga* y géneros relacionados 428

X PHYLUM 9: *BACTERIA* VERDES DEL AZUFRE 428
12.32 *Chlorobium* y otras *Bacteria* verdes del azufre 428

XI PHYLUM 10: ESPIROQUETAS 432
12.33 Espiroquetas 432

XII PHYLUM 11: DEINOCOCOS 435
12.34 *Deinococcus/Thermus* 435

XIII PHYLUM 12: *BACTERIA* VERDES NO DEL AZUFRE 436
12.35 *Chloroflexus* y *Heliothrix* 436

XIV PHYLA 13 Y 14: *BACTERIA* HIPERTERMÓFILAS MUY RAMIFICADAS 437
12.36 *Thermotoga* y *Thermodesulfobacterium* 437
12.37 *Aquifex, Thermocrinus* y géneros relacionados 438

XV PHYLA 15 Y 16: *NITROSPIRA* Y *DEFFERIBACTER* 439
12.38 *Nitrospira, Defferibacter* y géneros relacionados 439

CAPÍTULO 13
LA DIVERSIDAD PROCARIÓTICA: *ARCHAEA* 441

I FILOGENIA Y METABOLISMO GENERAL 442
13.1 Visión filogenética de *Archaea* 442
13.2 Conservación de la energía y autotrofia en *Archaea* 443

II PHYLUM EURYARCHAEOTA 444
13.3 Halófilos extremos 444
13.4 *Archaea* productoras de metano: metanógenos 448
13.5 Thermoplasmatales: *Thermoplasma, Ferroplasma* y *Picrophilus* 451
13.6 Euryarchaeota hipertermófilos: Thermococcales y *Methanopyrus* 454
13.7 Euryarchaeota hipertermófilos: Los Archaeglobales 455

III PHYLUM CRENARCHAEOTA 456
13.8 Hábitat y metabolismo energético de los Crenarchaeotas 456
13.9 Hipertermófilos de hábitat terrestres volcánicos: Sulfolobales y Thermoproteales 458
13.10 Hipertermófilos de hábitat volcánicos submarinos: Desulfurococcales 460

IV EVOLUCION Y VIDA A ALTAS TEMPERATURAS 464
13.11 Estabilidad térmica de las biomoléculas 464
13.12 *Archaea* hipertermófilos y evolución microbiana 465

CAPÍTULO 14
BIOLOGÍA DE LA CÉLULA EUCARIÓTICA Y MICROORGANISMOS EUCARIÓTICOS 468

I LA CÉLULA EUCARIÓTICA/ESTRUCTURA FUNCIÓN Y GENÉTICA 469
14.1 Estructura de la célula eucariótica y el núcleo 469

14.2 Orgánulos respiratorios: la mitocondria y el hidrogenosoma 470
14.3 Orgánulo fotosintético: el cloroplasto 472
14.4 Relaciones de las mitocondrias y cloroplastos con *Bacteria* 473
14.5 Otros orgánulos y estructuras celulares eucarióticas 474
14.6 Generalidades de la genética de eucariotas 475

II DIVERSIDAD MICROBIANA EN EUCARIOTAS 477
14.7 Generalidades filogenéticas de *Eukarya* 477
14.8 Protozoos 478
14.9 Hongos 482
14.10 Hongos mucosos 485
14.11 Algas 487

CAPÍTULO 15
GENÓMICA MICROBIANA 493

I TÉCNICAS DE CLONACIÓN GENÓMICA 494
15.1 Vectores para la clonación genómica y secuenciación 494
15.2 Clonación y mapas genómicos 497

II GENOMAS MICROBIANOS 498
15.3 Genomas procarióticos 499
15.4 Evolución y familias génicas 502
15.5 Búsqueda y utilización de la información genómica 503
15.6 Genomas de microorganismos eucarióticos 504
15.7 Genomas de orgánulos 505

III FUNCIÓN GÉNICA Y REGULACIÓN 508
15.8 Proteómica 508
15.9 Micromatrices (*microarrays*) 509

CAPÍTULO 16
VIRUS DE BACTERIAS, PLANTAS Y ANIMALES 512

I VIRUS DE PROCARIOTAS 513
16.1 Bacteriófagos con RNA 513
16.2 Bacteriófagos con DNA unicatenario: viriones icosaédricos 515
16.3 Bacteriófagos con DNA 517
unicatenario: viriones filamentosos 517
16.4 Bacteriófagos con DNA bicatenario: T7 518
16.5 Bacteriófagos con DNA bicatenario: un virus transponible 520

II VIRUS DE EUCARIOTAS 522
16.6 Virus de plantas 522
16.7 Virus de animales con RNA de cadena positiva 524
16.8 Virus de animales con RNA de cadena negativa 525
16.9 Virus con RNA bicatenario: reovirus 528
16.10 Replicación de virus de animales con DNA bicatenario 529
16.11 Virus con DNA bicatenario: herpesvirus 531
16.12 Virus con DNA bicatenario: poxvirus 532
16.13 Virus con DNA bicatenario: adenovirus 533
16.14 Virus que utilizan la transcriptasa inversa 534

UNIDAD III DIVERSIDAD METABÓLICA Y ECOLOGÍA MICROBIANA

CAPÍTULO 17
DIVERSIDAD METABÓLICA 593

I EL SISTEMA DE VIDA FOTOTRÓFICO 541
17.1 Fotosíntesis 541
17.2 Función de la clorofila y de la bacterioclorofila en la fotosíntesis 542
17.3 Carotenoides y ficobilinas 545
17.4 Fotosíntesis anoxigénica 548
17.5 Fotosíntesis oxigénica 552
17.6 Fijación autotrófica de CO_2: el ciclo de Calvin 555
17.7 Fijación autotrófica de CO_2: ciclo inverso del ácido cítrico y ciclo del hidroxipropionato 556

II QUIMIOLITOTROFIA: ENERGÍA A PARTIR DE LA OXIDACIÓN DE DONADORES DE ELECTRONES INORGÁNICOS 557
17.8 Donadores inorgánicos de electrones y energética 558
17.9 Oxidación del hidrógeno 559
17.10 Oxidación de compuestos reducidos del azufre 560
17.11 Oxidación del hierro 563
17.12 Nitrificación y anamox 565

III EL SISTEMA DE VIDA ANAERÓBICO 568
17.13 Respiración anaeróbica 568
17.14 Reducción de nitrato y proceso de desnitrificación 569
17.15 Reducción de sulfato 571
17.16 Acetogénesis 573
17.17 Metanogénesis 575
17.18 Hierro férrico, manganeso, clorato y aceptores orgánicos de electrones 579
17.19 Fermentaciones: consideraciones energéticas y redox 582
17.20 Diversidad fermentativa 585
17.21 Sintrofia 587

IV OXIDACIÓN DE HIDROCARBUROS Y PAPEL DEL O2 EN EL CATABOLISMO DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS 589
17.22 El oxígeno molecular (O_2) como reactante en procesos bioquímicos 589

17.23 Oxidación de hidrocarburos 589
17.24 Metanotrofia y metilotrofia 590
17.25 Utilización de hexosas, pentosas y polisacáridos 593
17.26 Metabolismo de los ácidos orgánicos 595
17.27 Los lípidos como nutrientes microbianos 596

V FIJACIÓN DEL NITRÓGENO 598

17.28 La nitrogenasa y el proceso de fijación de nitrógeno 598
17.29 Genética y regulación de la fijación de N_2 601

CAPÍTULO 18
MÉTODOS DE ECOLOGÍA MICROBIANA 606

I ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS BASADOS EN TÉCNICAS DE CULTIVO 607

18.1 Enriquecimiento y aislamiento 607
18.2 Aislamiento en cultivo axénico 611

II ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS 613

18.3 Viabilidad y cuantificación mediante técnicas de tinción 613
18.4 Tinciones genéticas 615
18.5 PCR: relacionando genes específicos con organismos específicos 617

III MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD MICROBIANA EN LA NATURALEZA 620

18.6 Radioisótopos y microelectrodos 620
18.7 Isótopos estables 621

CAPÍTULO 19
HÁBITAT MICROBIANOS, CICLOS DE NUTRIENTES E INTERACCIONES CON PLANTAS Y ANIMALES 624

I ECOSISTEMAS MICROBIANOS 625

19.1 Poblaciones, gremios y comunidades 626
19.2 Ambientes y microambientes 626
19.3 Crecimiento microbiano en superficies y biofilmes 628

II HÁBITAT MICROBIANOS TERRESTRES Y DE AGUA DULCE 630

19.4 Ambientes terrestres 630
19.5 Ambientes de agua dulce 634

III MICROBIOLOGÍA MARINA 635

19.6 Ambientes marinos y distribución de microorganismos 636
19.7 Microbiología de las profundidades marinas 638
19.8 Fuentes hidrotermales submarinas 639

IV CICLO DEL CARBONO Y DEL OXÍGENO 644

19.9 Ciclo del carbono 644
19.10 Sintrofia y metanogénesis 646
19.11 Ciclo del carbono en animales rumiantes 650

V OTROS CICLOS CLAVE DE NUTRIENTES 654

19.12 Ciclo del nitrógeno 654
19.13 Ciclo del azufre 656
19.14 Ciclo del hierro 658

VI BIORREMEDIO MICROBIANA 661

19.15 Lixiviado microbiano de menas minerales 661
19.16 Transformación del mercurio y de otros metales pesados 664
19.17 Biodegradación del petróleo 666
19.18 Biodegradación de compuestos xenobióticos 668

VII INTERACCIONES MICROBIANAS CON PLANTAS 671

19.19 El ambiente vegetal 671
19.20 Líquenes y micorrizas 672
19.21 Tumoración por *Agrobacterium* 675
19.22 Bacterias de los nódulos radicales y simbiosis con leguminosas 677

UNIDAD IV INMUNOLOGÍA, PATOGENIA Y RESPUESTAS DEL HOSPEDADOR

CAPÍTULO 20
CONTROL DEL CRECIMIENTO MICROBIANO 687

I CONTROL FÍSICO ANTIMICROBIANO 689

20.1 Esterilización por calor 689
20.2 Esterilización por radiación 692
20.3 Esterilización por filtración 694

II CONTROL QUÍMICO ANTIMICROBIANO 696

20.4 Control químico del crecimiento 696
20.5 Antisépticos, desinfectantes y esterilizantes 698

III AGENTES ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS *IN VIVO* 699

20.6 Antimicrobianos sintéticos 701
20.7 Antimicrobianos naturales: antibióticos 704
20.8 Antibióticos β-lactámicos: penicilinas y cefalosporinas 705
20.9 Antibióticos producidos por procariotas 707

IV CONTROL DE VIRUS Y DE PATÓGENOS EUCARIÓTICOS 708

20.10 Antivíricos 708
20.11 Antifúngicos 710

V RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS Y DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS ANTIMICROBIANOS **711**

20.12 Resistencia a antimicrobianos 711
20.13 Búsqueda de nuevos antimicrobianos 715

CAPÍTULO 21
RELACIONES HOSPEDADOR-PARÁSITO EN HUMANOS **719**

I INTERACCIONES MICROBIANAS BENEFICIOSAS CON HUMANOS **720**

21.1 Generalidades de las interacciones microbianas beneficiosas con humanos 720
21.2 Biota normal (microbiota) de la piel 722
21.3 Biota normal (microbiota) de la cavidad bucal 723
21.4 Biota normal (microbiota) del tracto gastrointestinal 725
21.5 Biota normal (microbiota) de otras regiones del cuerpo 727

II INTERACCIONES DAÑINAS DE MICROORGANISMOS CON HUMANOS **729**

21.6 Entrada del patógeno en el hospedador 729
21.7 Colonización y crecimiento 731
21.8 Virulencia 732

III FACTORES DE VIRULENCIA Y TOXINAS **734**

21.9 Factores de virulencia 735
21.10 Exotoxinas 735
21.11 Enterotoxinas 738
21.12 Endotoxinas 740

IV DEFENSAS INESPECÍFICAS DEL HOSPEDADOR **741**

21.13 Resistencia no específica a la infección 741
21.14 Inflamación y fiebre 744

CAPÍTULO 22
INMUNOLOGÍA ESENCIAL **747**

I GENERALIDADES DE LA RESPUESTA INMUNITARIA **749**

22.1 Células y órganos del sistema inmunitario 749
22.2 Inmunidad inespecífica 752
22.3 La respuesta inmunitaria específica 754

II ANTÍGENOS, CÉLULAS T E INMUNIDAD CELULAR **756**

22.4 Inmunógenos y antígenos 756
22.5 Presentación de antígenos a los linfocitos T 757
22.6 Las células T citotóxicas (Tc) y las asesinas naturales (NK) 760
22.7 Las células T cooperadoras: la respuesta inmunitaria activada 761

III ANTICUERPOS E INMUNIDAD **763**

22.8 Anticuerpos (inmunoglobulinas) 763
22.9 Los linfocitos B y la producción de anticuerpos 766
22.10 Complemento, anticuerpos y destrucción de patógenos 767

IV LA RESPUESTA INMUNITARIA PARA PREVENIR LA ENFERMEDAD **769**

22.11 Inmunidad para prevenir la enfermedad 769
22.12 Nuevas estrategias de inmunización 772

V INMUNIDAD FRENTE A LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS **773**

22.13 Alergia, hipersensibilidad y autoinmunidad 773
22.14 Superantígenos 776

CAPÍTULO 23
INMUNOLOGÍA MOLECULAR **779**

I LOS GENES DE LA SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS **780**

23.1 Receptores de la superficie celular e inmunidad 780

II EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) **781**

23.2 Estructura de las proteínas del MHC 782
23.3 Polimorfismo y genes del MHC 783

III ANTICUERPOS **784**

23.4 Anticuertos y unión al antígeno 784
23.5 Los genes de los anticuerpos y la diversidad 785

IV LOS RECEPTORES DE LAS CÉLULAS T **787**

23.6 Las proteínas del TCR y la unión al antígeno 787
23.7 Genes del TCR y diversidad 788

V SEÑALES MOLECULARES E INMUNIDAD **789**

23.8 Selección clonal y tolerancia 789
23.9 Señales secundarias 791
23.10 Citoquinas y quimioquinas 792

CAPÍTULO 24
MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA **796**

I MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DEPENDIENTES DEL CULTIVO **797**

24.1 Aislamiento de patógenos de muestras clínicas 797
24.2 Métodos de identificación dependientes del cultivo 803
24.3 Cultivos de prueba de sensibilidad antibiótica 807
24.4 Seguridad en el laboratorio clínico 809

II INMUNOLOGÍA Y MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CLÍNICO 810
- 24.5 Inmunodiagnóstico para enfermedades infecciosas 810
- 24.6 Anticuerpos policlonales y monoclonales 812
- 24.7 Reacciones antígeno-anticuerpo in vitro: serología 816
- 24.8 Aglutinación 818
- 24.9 Microscopía inmunoelectrónica 820
- 24.10 Anticuerpos fluorescentes 820
- 24.11 Enzimoinmunoanálisis y radioinmunoanálisis 823
- 24.12 Técnicas de inmunotransferencia 828

III MÉTODOS MOLECULARES Y VISUALES EN EL DIAGNÓSTICO 830
- 24.13 Sondas de ácidos nucleicos 830
- 24.14 Virología diagnóstica 835

UNIDAD V INFECCIONES MICROBIANAS

CAPÍTULO 25
EPIDEMIOLOGÍA 838

I PRINCIPIOS DE EPIDEMIOLOGÍA 839
- 25.1 La epidemiología como ciencia 839
- 25.2 Terminología epidemiológica 840
- 25.3 Reservorios de la enfermedad y epidemias 842
- 25.4 Transmisión de enfermedades infecciosas 845
- 25.5 La comunidad de hospedadores 848

II EPIDEMIOLOGÍA 850
- 25.6 La epidemia de SIDA 850
- 25.7 Infecciones adquiridas en los hospitales (nosocomiales) 852

III EPIDEMIOLOGÍA Y SALUD PÚBLICA 854
- 25.8 Medidas de salud pública para el control de enfermedades 854
- 25.9 Consideraciones sobre la salud global 856
- 25.10 Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes 857
- 25.11 Guerra biológica (bioterrorismo) y armas biológicas 864

CAPÍTULO 26
ENFERMEDADES MICROBIANAS TRANSMITIDAS DE PERSONA A PERSONA 867

I TRANSMISIÓN DE ENFERMEDADES POR EL AIRE 868
- 26.1 Transmisión de patógenos por el aire 869
- 26.2 Enfermedades producidas por *streptococcus* 870
- 26.3 *Corynebacterium* y difteria 872
- 26.4 *Bordetella* y tosferina 873
- 26.5 Mycobacterium y tuberculosis 874
- 26.6 *Neisseria meningitidis*, meningitis y meningococemia 878
- 26.7 Virus e infecciones respiratorias 879
- 26.8 Resfriados y gripe 881

II TRANSMISIÓN DE ENFERMEDADES POR CONTACTO DIRECTO 885
- 26.9 Estafilococos 885
- 26.10 *Helicobacter pylori* y las úlceras gástricas 886
- 26.11 Virus que producen hepatitis 887

III ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL 889
- 26.12 Gonorrea y sífilis 890
- 26.13 *Chlamydia*, herpes y tricomoniasis 893
- 26.14 Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) 896

CAPÍTULO 27
ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ANIMALES, POR ARTRÓPODOS Y POR MICROORGANISMOS DEL SUELO 905

I ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ANIMALES 906
- 27.1 La rabia 906
- 27.2 Síndrome pulmonar por hantavirus 908

II ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ARTRÓPODOS 909
- 27.3 Enfermedades producidas por *Rickettsia* 910
- 27.4 Enfermedad de Lyme 912
- 27.5 Malaria 915
- 27.6 La peste 918

III ENFERMEDADES TRANSMITIDAS A PARTIR DEL SUELO 921
- 27.7 Los hongos patógenos 921
- 27.8 Tétanos 923

CAPÍTULO 28
TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES, POTABILIZACIÓN DE AGUAS Y ENFERMEDADES MICROBIANAS TRANSMITIDAS POR EL AGUA 926

I MICROBIOLOGÍA DE LAS AGUAS RESIDUALES Y POTABILIZACIÓN DEL AGUA 927
- 28.1 Salud pública y calidad del agua 927
- 28.2 Tratamiento de aguas residuales y contaminadas 929
- 28.3 Potabilización del agua para el consumo humano 932

II ENFERMEDADES MICROBIANAS TRANSMITIDAS POR EL AGUA 934
- 28.4 Fuentes de infecciones transmitidas por el agua 934

28.5 Cólera 935
28.6 Giardiasis y criptosporidiasis 936
28.7 Legionelosis (enfermedad del legionario) 938
28.8 Fiebres tifoideas y otras enfermedades transmitidas por el agua 939

CAPÍTULO 29
CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS Y ENFERMEDADES MICROBIANAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS **942**

I CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS Y CRECIMIENTO MICROBIANO **943**
29.1 Crecimiento microbiano y alteración de los alimentos 943
29.2 Conservación de los alimentos 944

II ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS **947**
29.3 Enfermedades transmitidas por los alimentos y detección de microorganismos 947
29.4 Intoxicación alimentaria por estafilococos 948
29.5 Intoxicación alimentaria por clostridios 949
29.6 Salmonelosis 951
29.7 Cepas patógenas de *Escherichia coli* 952
29.8 *Campylobacter* 953
29.9 Listeriosis 953
29.10 Otras enfermedades infecciosas transmitidas por alimentos 954

UNIDAD VI LOS MICROORGANISMOS COMO HERRAMIENTAS EN LA INDUSTRIA Y EN LA INVESTIGACIÓN

CAPÍTULO 30
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL Y BIOCATÁLISIS **958**

I MICRORGANISMOS INDUSTRIALES, PRODUCTOS Y FORMACIÓN DE PRODUCTOS **958**
30.1 Microorganismos industriales y productos industriales 958
30.2 Crecimiento y formación del producto en biocatálisis 959
30.3 Características de las fermentaciones a gran escala 961
30.4 Escalado de la fermentación 963

II PRINCIPALES PRODUCTOS DE LA MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL **964**
30.5 Antibióticos: aislamiento y caracterización 964
30.6 Producción industrial de penicilinas y tetraciclinas 967
30.7 Vitaminas y aminoácidos 969
30.8 Bioconversión microbiana 971
30.9 Enzimas 972
30.10 Vinagre 974
30.11 Ácido cítrico y otros compuestos orgánicos 975
30.12 Levadura como agente de fermentación y como suplemento alimenticio 976
30.13 Alcohol y bebidas alcohólicas 978
30.14 Las setas como fuente de alimento 983

CAPÍTULO 31
INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA **986**

I TÉCNICAS DE LA INGENIERÍA GENÉTICA **987**
31.1 Resumen de los principios fundamentales de la ingeniería genética 987
31.2 Hospedadores para vectores de clonación 989
31.3 Búsqueda del clon idóneo 991
31.4 Vectores especializados 993
31.5 Expresión de genes de mamíferos en bacterias 996

II APLICACIONES PRÁCTICAS DE LA INGENIERÍA GENÉTICA **1000**
31.6 Obtención de productos de mamíferos y de vacunas mediante organismos genéticamente modificados 1000
31.7 Ingeniería genética en plantas agrícolas 1005
31.8 Ingeniería genética en animales y en genética humana 1008

APÉNDICE 1
CÁLCULOS DE ENERGÍA EN BIOENERGÉTICA MICROBIANA **A-1**

APÉNDICE 2
MANUAL DE BERGEY DE BACTERIOLOGÍA SISTEMÁTICA, SEGUNDA EDICIÓN **A-5**

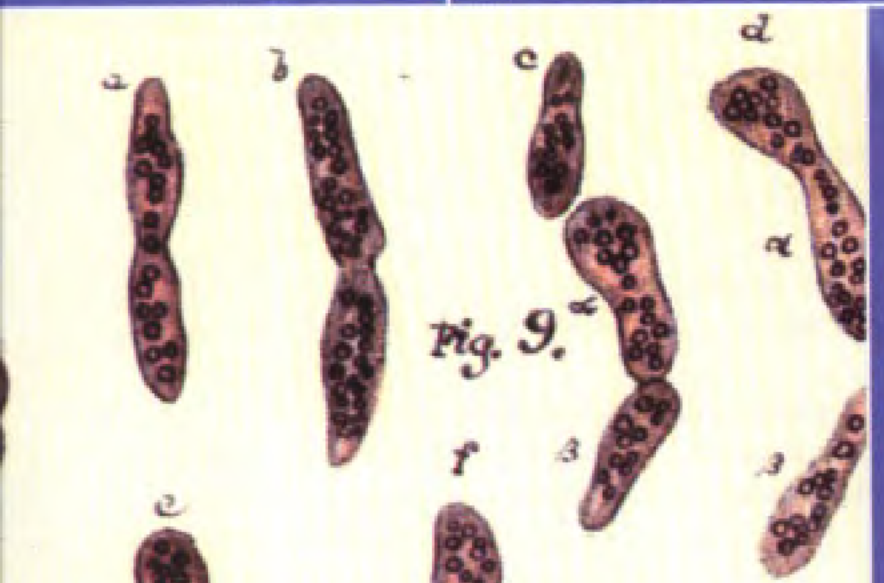
GLOSARIO **G-1**

ÍNDICE **I-1**

El campo de la microbiología surgió a partir de los estudios pioneros de un pequeño grupo de científicos, como el gran microbiólogo ruso Sergei Winogradsky. Mientras que otros gigantes de esta etapa inicial se centraron en resaltar la importancia de los microorganismos como agentes etiológicos de enfermedades, Winogradsky estudió las bacterias que están relacionadas con los ciclos de los nutrientes más importantes en la naturaleza. Sus descripciones gráficas de los microorganismos, como la que se muestra aquí sobre bacterias fototrofas rojas del azufre, son notables por su precisión artística y ayudaron a otros científicos de la época a comprender la amplia diversidad metabólica de los microorganismos que pueblan la Tierra.

1

MICROORGANISMOS Y MICROBIOLOGÍA



I INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA 1
1.1 Microbiología 1
1.2 Los microorganismos como células 2
1.3 Los microorganismos y sus ambientes naturales 4
1.4 El impacto de los microorganismos sobre el hombre 7
II LOS CAMINOS DEL DESCUBRIMIENTO EN MICROBIOLOGÍA 9
1.5 Raíces históricas de la microbiología 9
1.6 Diversidad microbiana y nacimiento de la microbiología molecular 16

Glosario

Célula unidad fundamental de la materia viva

Citoplasma porción fluida de una célula limitada por la membrana celular exceptuando el núcleo (si existe)

Cultivo de enriquecimiento método para aislar microorganismos usando medios de cultivo y condiciones de incubación específicas

Cultivo axénico *o* **puro** cultivo que contiene una única clase de microorganismo

DNA ácido desoxirribonucleico, material hereditario de las células y de algunos virus

Ecología estudio de los organismos en sus ambientes naturales

Ecosistema conjunto formado por los organismos más su medio ambiente

Enzimas proteínas catalíticas que funcionan acelerando las reacciones químicas

Estéril ausencia de cualquier organismo vivo y de virus

Evolución cambio de una línea de descendencia a lo largo del tiempo para dar origen a la producción de una nueva especie o variedad

Generación espontánea hipótesis que supone que los organismos vivos se pueden originar de materia inerte

Hábitat lugar de residencia de una población microbiana en un medio

Metabolismo conjunto de reacciones bioquímicas de una célula

Microorganismo organismo microscópico constituido por una sola célula o varias, incluyendo los virus

Patógeno microorganismo que causa enfermedad

Procariota célula que carece de núcleo y otros organelos

RNA ácido ribonucleico, implicado en la síntesis de proteínas como RNA mensajero, RNA de transferencia y RNA ribosómico

Con este capítulo introductorio comenzamos nuestro viaje a través del campo de la microbiología. En él descubriremos qué son los microorganismos y por qué deberíamos conocerlos. También nos dedicaremos a presentar la ciencia de la microbiología en una perspectiva histórica adecuada, resaltando algunas aportaciones destacables tanto de los primeros microbiólogos como de los más recientes. La microbiología es hoy una ciencia dinámica que tiene ramificaciones en prácticamente todos los aspectos de la vida humana, tales como la medicina, la agricultura y el medio ambiente. ¡Bienvenidos al estudio de la microbiología!

I INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA

En las cuatro primeras secciones de este capítulo presentamos el objeto de la microbiología, consideramos los microorganismos como células, examinamos dónde y cómo viven en la naturaleza y citamos el impacto que los microorganismos tienen, y continúan teniendo, en las actividades humanas.

1.1 Microbiología

La microbiología es el estudio de los microorganismos, un grupo amplio y diverso de organismos microscópicos que existen como células aisladas o asociadas; también incluye el estudio de los virus, que son microscópicos pero no celulares. Las células microbianas se distinguen pues de las células de animales y plantas, en que son incapaces de vivir aisladas en la naturaleza y sólo existen formando parte de organismos multicelulares (Figura 1.1). En general, a diferencia de los macroorganismos, los microorganismos son capaces de realizar sus procesos vitales de crecimiento, generación de energía y reproducción, independientemente de otras células, sean de la misma clase o de otra diferente.

La ciencia de la microbiología

La microbiología trata de las células vivas y su funcionamiento. Estudia los microorganismos, especialmente las bacterias, un amplio grupo de células con una enorme importancia básica y aplicada. Trata de la diversidad microbiana y de la evolución, de cómo surgieron las diferentes clases de microorganismos y por qué. Analiza también lo que los microorganismos hacen en el mundo en general, en la sociedad humana, en el cuerpo humano, y en los cuerpos de animales y plantas. De un modo u otro, los microorganismos influyen en todas las formas vivas de la Tierra y, por tanto, la ciencia de la microbiología tiene una gran trascendencia.

La microbiología gira en torno a dos temas fundamentales, uno básico y otro aplicado:

1. Como ciencia biológica *básica*, la microbiología proporciona algunas de las herramientas de investigación más adecuadas para estudiar la naturaleza de los procesos vitales. El avanzado conocimiento que ahora tenemos de las bases físicas y químicas de la vida procede del estudio de los microorganismos. Se debe en parte a que las células microbianas comparten muchas propiedades bioquímicas con las células de organismos pluricelulares; de hecho, *todas* las células tienen mucho en común; unido al hecho de que las células microbianas pueden crecer hasta alcanzar una elevada densidad en cultivo en el laboratorio y son fácilmente manipulables en estudios bioquímicos y genéticos, hace de ellas excelentes modelos para el conocimiento de las funciones celulares en organismos superiores.

2. Como ciencia biológica *aplicada*, la microbiología trata de muchos problemas prácticos importantes en la medicina, la agricultura y la industria. Muchas de las enfermedades más importantes del hombre, de otros animales y de las plantas, son producidas por microorganismos. Los microorganismos también desempeñan una función destacada en la fertilidad del suelo y en la producción de animales domésticos. Además, muchos

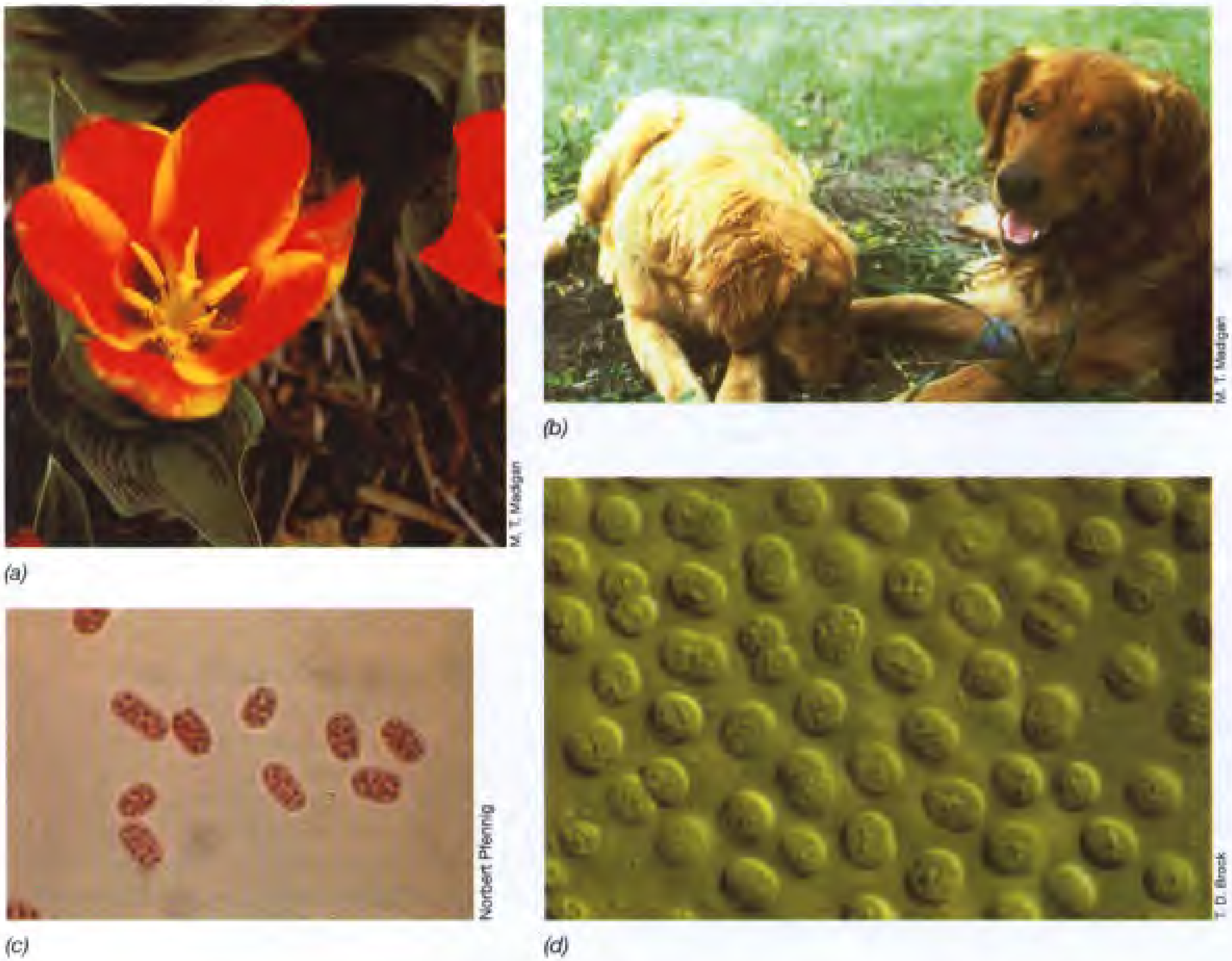


Figura 1.1 Los organismos vivos se componen de células. (a) Plantas y (b) animales se componen de muchas células que forman tejidos, y éstos forman órganos, por lo que se denominan *pluricelulares*. Una célula aislada de un animal o una planta no puede tener una existencia independiente y cada una es dependiente de las otras. (c, d) Los microorganismos son células de vida independiente. Una célula microbiana aislada puede tener vida independiente. En las micrografías se muestran microorganismos fotosintéticos llamados (c) *bacterias rojas* y (d) *cianobacterias*. Las cianobacterias fueron los primeros fototrofos que produjeron O_2 en la Tierra y los responsables de la aparición de oxígeno en la atmósfera.

procesos industriales y biotecnológicos a gran escala, como la producción de antibióticos o de proteínas humanas, se basan en la utilización de microorganismos.

Importancia de los microorganismos

A medida que este libro se vaya desarrollando, se irá haciendo más evidente la función central de los microorganismos tanto en la actividad humana como en el complejo entramado de la vida sobre la Tierra. Veremos cómo en ausencia de los microorganismos las formas superiores de vida nunca habrían surgido ni podrían mantenerse en la actualidad; consideremos, por ejemplo, que el mismo oxígeno que respiramos es el resultado de la actividad microbiana (Figura 1.1d). Además, veremos cómo los hombres, las plantas y los animales están íntimamente ligados a las actividades microbianas en cuanto al reciclado de los nutrientes esenciales o a la degradación de materia orgánica. En efecto, ninguna otra forma de vida tiene una importancia similar a la de los microorganismos en el mantenimiento de la vida sobre la Tierra. Aprenderemos también que los microorganismos existieron en la Tierra durante miles de millones de años antes de que aparecieran las plantas y los animales, cómo sus características fisiológicas los convierten en los mayores químicos de la Tierra, y cómo los microorganismos han establecido relaciones con los organismos superiores que pueden ser muy beneficiosas o extremadamente dañinas.

Comenzamos nuestro viaje considerando a los microorganismos como entidades celulares.

1.2 Los microorganismos como células

La **célula** es la unidad de vida fundamental. Una célula es una entidad aislada de otras células por una membrana celular (y tal vez por una pared celular) que contiene en su interior diversos compuestos y estructuras subcelulares (Figura 1.2). La **membrana celular** es la barrera que separa el interior de la célula del exterior. Dentro de la membrana celular se encuentran las diversas estructuras y componentes que hacen posible que la célula funcione. Son estructuras clave el **núcleo** o **nucleoide**, donde se guarda la *información genética*, el ácido desoxirribonucleico (DNA) necesario para hacer nuevas células, y el citoplasma, donde se encuentra la *maquinaria* para el crecimiento y otras funciones celulares.

Todas las células están formadas por cuatro tipos de componentes químicos: **proteínas**, **ácidos nucleicos**, **lípidos** y **polisacáridos**. En conjunto, se denominan *macromoléculas*. La naturaleza química y la disposición de las macromoléculas de una célula de un organismo es lo que diferencia una célula de otro organismo. Aunque cada tipo de célula tiene una estructura y un tamaño definido, una célula es una unidad dinámica, que realiza constantes cambios reemplazando sus componentes. Incluso cuando no está creciendo, una célula puede estar tomando materiales del medio para incorporarlos a su propia estructura. Al mismo tiempo, libera productos de desecho en el medio. Por tanto, una célula es un *sistema abierto* en constante cambio y, sin embargo, permanece igual.

¿De dónde proceden las primeras células? De alguna forma, la primera célula debió de originarse a partir de algo no celular, algo anterior a la célula, una estructura pre-celular. Aunque la formación de la primera célula hace más de 3.800 millones de años fue un suceso poco probable, que debió necesitar varios cientos de millones de años para que ocurriera, una vez que la primera célula apareció se produjeron una serie de sucesos altamente probables, tales como el crecimiento y la división, originándose poblaciones de células a partir de las cuales tuvo lugar la evolución mediante la selección de nuevas características y mayor diversidad. De ese modo, a través de miles de millones de años de cambio evolutivo, surgió la impresionante diversidad de tipos celulares que existen en la actualidad. Debido a que todas las células están construidas con las cuatro clases de macromoléculas básicas mencionadas anteriormente y comparten muchos rasgos en común, se piensa que todas las células descienden de un antecesor común, el *antecesor universal* de la vida (*véase* Capítulo 11).

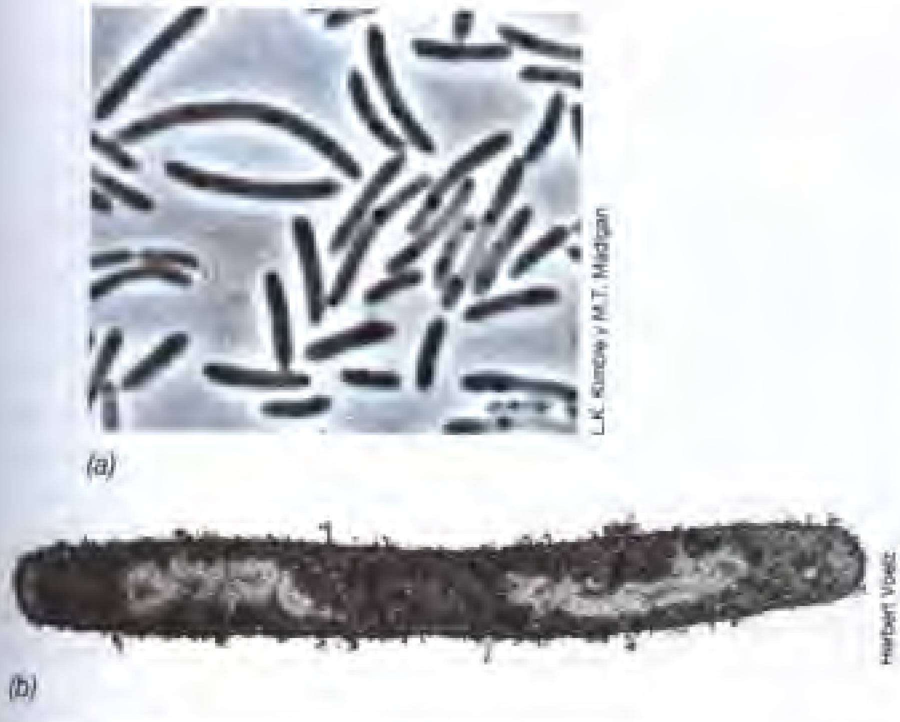


Figura 1.2 Células. (a) Micrografía de células bacterianas con forma de bacilo vistas al microscopio óptico; una célula aislada tiene aproximadamente 1 mm de diámetro. (b) Sección longitudinal de una célula bacteriana vista al microscopio electrónico. Las dos áreas más claras representan el nucleoide, región de la célula que contiene el DNA.

Características de los sistemas vivos

¿Cuáles son las propiedades esenciales de la vida? ¿Qué diferencia las células de los objetos inanimados? Nuestro concepto de lo que significa «vivo» está determinado por lo que podemos observar hoy en la Tierra o podemos deducir del registro fósil. Pero de lo que sabemos hoy en biología, podemos identificar varias características que son compartidas por la mayoría de los sistemas vivos, y que se resumen en la Figura 1.3.

Todos los organismos celulares son estructuras altamente organizadas que muestran alguna forma de **metabolismo**. Esto es, las células toman sustancias químicas del medio y las transforman, conservan parte de la energía de dichas sustancias de modo que las células puedan usarla, y luego eliminan los productos de desecho. Todas las células poseen **reproducción**, es decir, son capaces de dirigir una serie de reacciones bioquímicas que conduce a su propia síntesis. Como resultado de los procesos metabólicos, una célula crece y se divide para formar dos células. Muchas células sufren **diferenciación**, un proceso por el que se forman nuevas sustancias o estructuras. A menudo, la diferenciación celular es parte de un ciclo vital en el que las células forman estructuras especiales relacionadas con la reproducción, la dispersión o la supervivencia.

Las células responden a señales químicas en su medio ambiente, tales como las producidas por otras células. Por tanto pueden comunicarse e incluso estimar su propio número en el ambiente circundante por medio de pequeñas moléculas que se difunden y pasan entre células vecinas. Con frecuencia los organismos vivos tienen **movimiento** por autopropulsión, y en el mundo microbiano veremos diferentes mecanismos responsables de la movilidad. Finalmente, a diferencia de las estructuras inertes, las células pueden *evolucionar*. A través del proceso de **evolución** las células pueden cambiar permanentemente sus características y transmitir las nuevas propiedades a su descendencia.

Las células como máquinas y como sistemas codificados

Las células se pueden considerar bajo dos aspectos. Por un lado, las células pueden ser consideradas como *máquinas químicas* que llevan a cabo transformaciones químicas dentro de los límites de la estructura celular. Los catalizadores de esta máquina química son las **enzimas**, proteínas capaces de acelerar notablemente la velocidad de reacciones químicas específicas. Por otro lado, las células también pueden ser consideradas como *sistemas codificados*, análogos a las computadoras, que guardan y procesan la información genética (DNA) que pasa finalmente a la descendencia durante la reproducción (Figura 1.4). La duplicación y el procesamiento de la información genética almacenada se tratará en el Capítulo 7, donde se describirán con detalle las funciones importantes de la *replicación del DNA*, su *transcripción* y su *traducción*.

En realidad, las células son máquinas químicas y sistemas codificados, y el enlace entre estos dos atributos es el *crecimiento*. En condiciones adecuadas, una célula viable aumenta de tamaño y luego se divide para formar dos células (Figura 1.4). En el proceso ordenado que supone la división celular, la cantidad de todos los constituyentes de la célula se *duplica*. Esto implica el funcionamiento de la maquinaria química de la célula que suministra la energía y los precursores necesarios para la biosíntesis de las macromoléculas. Pero cuando una célula se divide, cada una de las dos células resultantes debe contener toda la información genética necesaria para la formación de más células y, por tanto, durante el proceso de crecimiento debe haber también una duplicación del DNA (Figura 1.4). En consecuencia, tanto la máquina como el código deben estar funcionalmente coordinados para lograr que una célula se reproduzca con fidelidad. Veremos más tarde que esto se produce y que además de la *coordinación*, las diversas funciones de la máquina y del código están sujetas a una *regulación*, de modo que la célula se adapta a su medio ambiente.

✓ 1.2 Revisión de conceptos

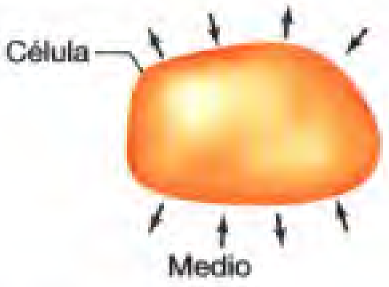
La célula presenta una barrera, la membrana citoplasmática, que separa el citoplasma del medio externo. Otras características celulares son el núcleo o nucleoide, la pared celular y el citoplasma. Algunas funciones clave tales como el metabolismo y la reproducción son propias de todo ser vivo, y las células pueden ser consideradas conceptualmente como máquinas bioquímicas y como sistemas biológicos codificados.

- ✓ Indique seis características asociadas con los organismos vivos. ¿Por qué es importante cada una de esas características para la supervivencia de una célula?
- ✓ Compare las funciones de una célula microbiana en cuanto máquina y sistema de codificación ¿Por qué ambas son necesarias?
- ✓ Cite las cuatro clases de macromoléculas de la célula.

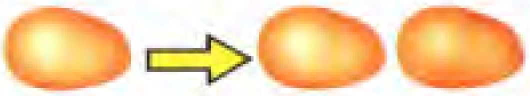
1.3 Los microorganismos y sus ambientes naturales

En la naturaleza, las células viven asociadas a otras en conjuntos llamados **poblaciones**. Tales poblaciones se componen de grupos de células relacionadas, que generalmente derivan de una única célula parental por divisiones celulares sucesivas. El lugar donde vive una población microbiana en un determinado ambiente se denomina **hábitat**. Los microorganismos pueden encontrarse tanto en ambientes familiares como en lugares poco comunes, como aquellos tan extremos que se consideran inadecuados para formas de vida superiores. Las poblaciones celulares raramente viven solas en la naturaleza, antes bien se relacionan con otras formando las llamadas **comunidades microbianas** (Figura 1.5). Estas comunidades pueden estar integradas por células libres en medios acuáticos, pero a menudo forman los llamados *biofilms* sobre superficies vivas o inertes (*véase* Sección 19.3).

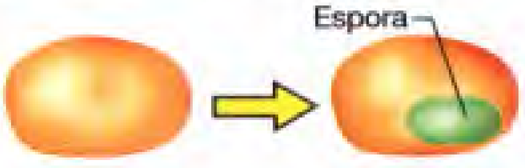
1. Metabolismo
Incorporación de nutrientes del medio, su transformación en la célula y eliminación de desechos al medio. La célula es por tanto un sistema *abierto*.



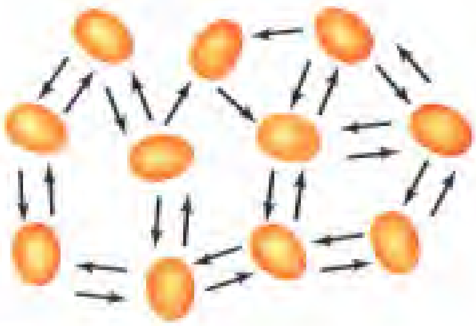
2. Reproducción (crecimiento)
Las sustancias del medio se transforman en nuevas células bajo la dirección de células preexistentes.



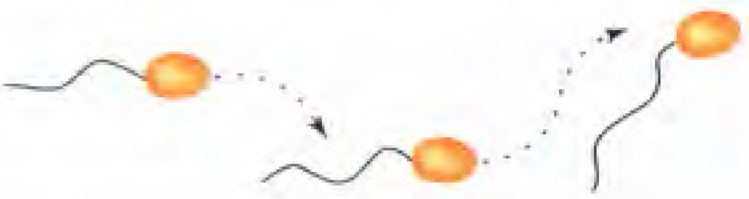
3. Diferenciación
Formación de una nueva estructura celular, como la espora, normalmente como parte de un *ciclo de vida* celular.



4. Comunicación
Las células se *comunican* o *interaccionan* mediante sustancias que son liberadas o captadas.



5. Movimiento
A menudo los organismos tienen movimiento propio.



6. Evolución
Las células *evolucionan* adquiriendo nuevas propiedades biológicas. Los árboles filogenéticos muestran las relaciones evolutivas entre las células.

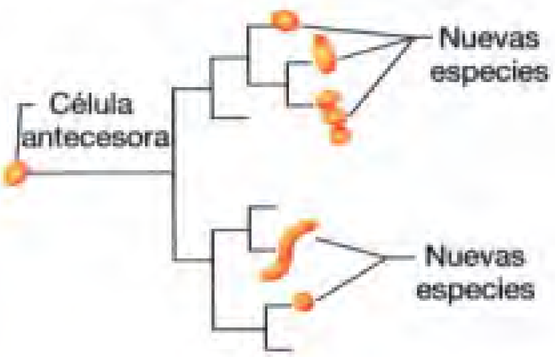


Figura 1.3 Los distintivos de la vida celular. La diferenciación y la movilidad no son propiedades de todas las células microbianas.

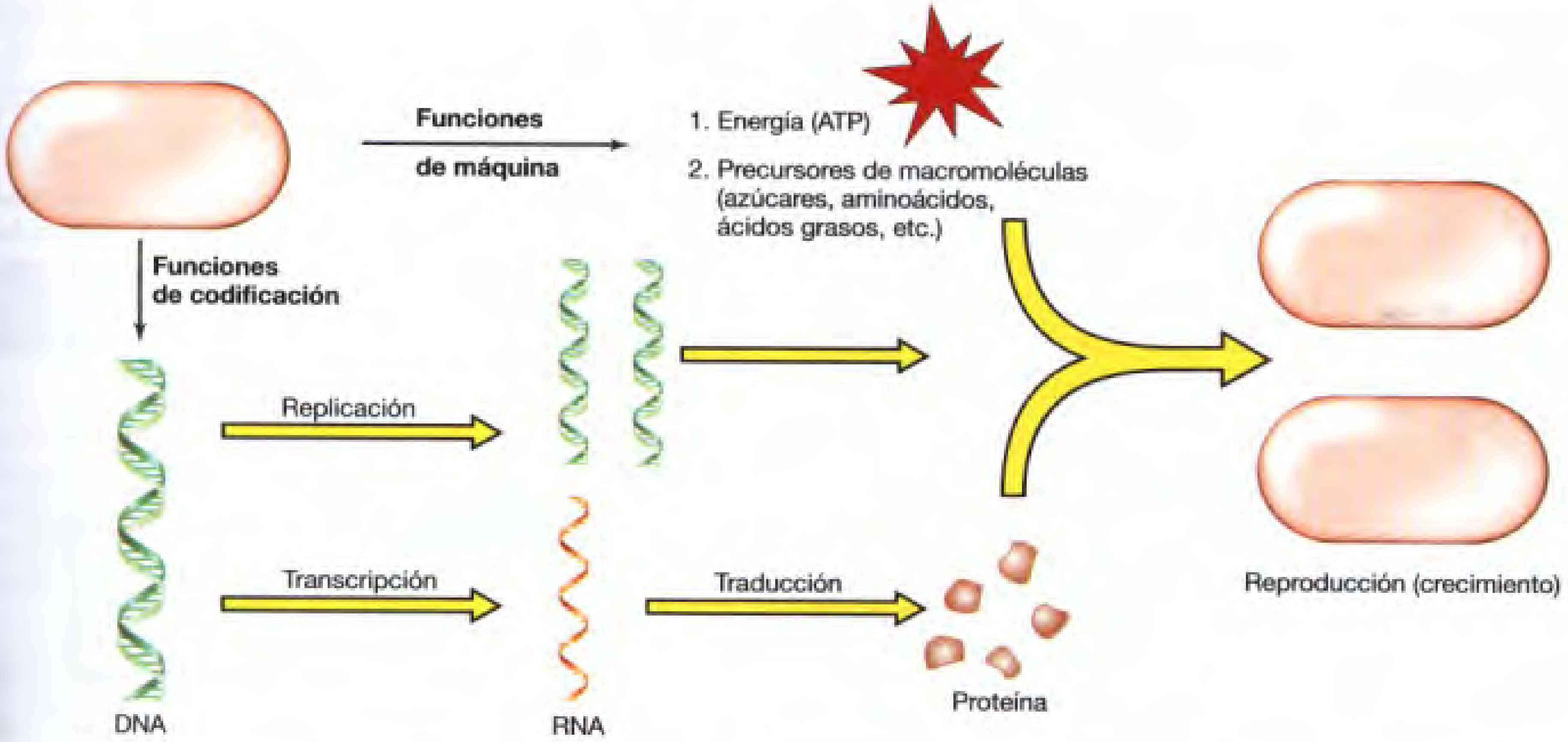
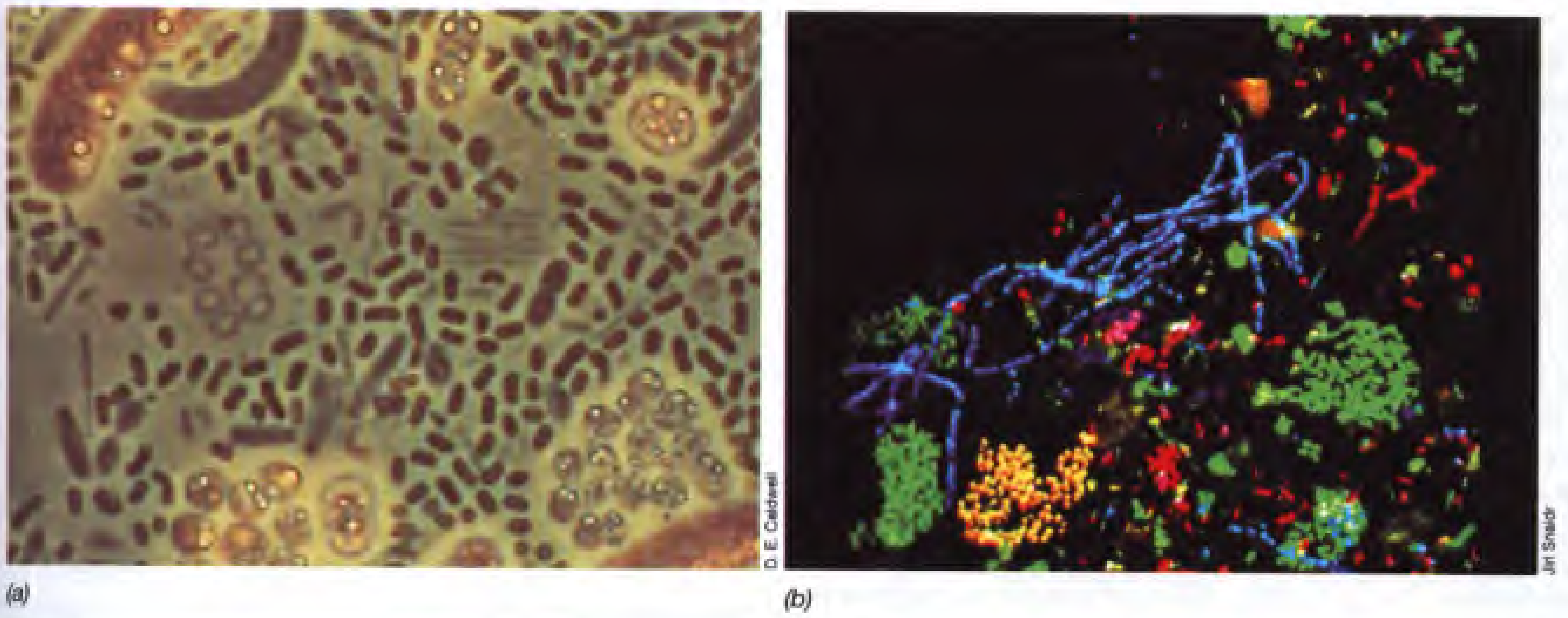


Figura 1.4 La célula tiene funciones mecánicas de codificación. Para que una célula se reproduzca debe disponer de un suministro adecuado de energía y de precursores para la síntesis de nuevas macromoléculas, el material genético debe duplicarse de modo que en la división cada célula reciba una copia. Por otra parte, los genes deben expresarse (mediante los procesos de transcripción y traducción) para formar las cantidades requeridas de proteínas y otras macromoléculas necesarias para hacer la nueva célula.

Efecto de los organismos entre sí y en sus hábitat

Las poblaciones de las comunidades microbianas se relacionan de varios modos y tales interacciones pueden ser perjudiciales o beneficiosas. En muchos casos, las poblaciones interaccionan y cooperan en sus funciones nutricionales con los productos de desecho derivados de las actividades metabólicas de algunas células sirviendo como nutrientes para otras. Los organismos de un hábitat también se relacionan con su ambiente físico y químico. Los hábitat tienen características diferentes, y un hábitat que favorece el crecimiento de un organismo puede ser dañino para otro. Por tanto, la composición de una comunidad microbiana en un hábitat concreto está determinada en gran parte por las características físicas y químicas de ese medio. En conjunto, denominamos **ecosistema** a los organismos y


D. E. Caldwell

Jiri Snaidr

(a) *(b)*

Figura 1.5 Ejemplos de comunidades microbianas. (a) Micrografía de una comunidad bacteriana que se desarrolla en las profundidades de un pequeño lago (Lago Wintergreen, Michigan); se muestran células de varios tamaños. (b) Comunidad microbiana en una muestra de sedimentos de agua residuales. La muestra se tiñó con una serie de colorantes, cada uno de los cuales tiñe un grupo bacteriano diferente (*véanse* Sección 18.4 y Figura 18.11*b* para detalles sobre la tinción). De R. Amann, J. Snaidr, M. Wagner, W. Ludwig y K. H. Schleifer, 1996. Journal of Bacteriology 178: 3496–3500, Fig. 2b. ©1996 American Society for Microbiology.

a los componentes físicos y químicos de su medio. Hay importantes ecosistemas microbianos acuáticos (océanos, estanques, lagos, corrientes, fuentes termales...), terrestres (suelos, rocas...) e incluso asociados a organismos superiores, plantas o animales.

Las propiedades de un ecosistema están controladas en gran parte por las actividades microbianas. Los organismos obtienen los nutrientes del medio para sus procesos metabólicos y los usan para formar nuevas células. Al mismo tiempo, los organismos eliminan al medio los productos de desecho de su metabolismo. Así, con el tiempo, un ecosistema microbiano puede cambiar gradualmente, tanto desde el punto de vista físico como químico. El oxígeno gaseoso constituye un buen ejemplo. Como veremos más adelante, el oxígeno molecular, O_2, es un nutriente vital para algunos microorganismos mientras que es venenoso para otros. Sin embargo, las actividades de un grupo de organismos que consuma oxígeno puede cambiar un hábitat a condiciones anóxicas adecuadas para el crecimiento de organismos que antes se habían mantenido a raya.

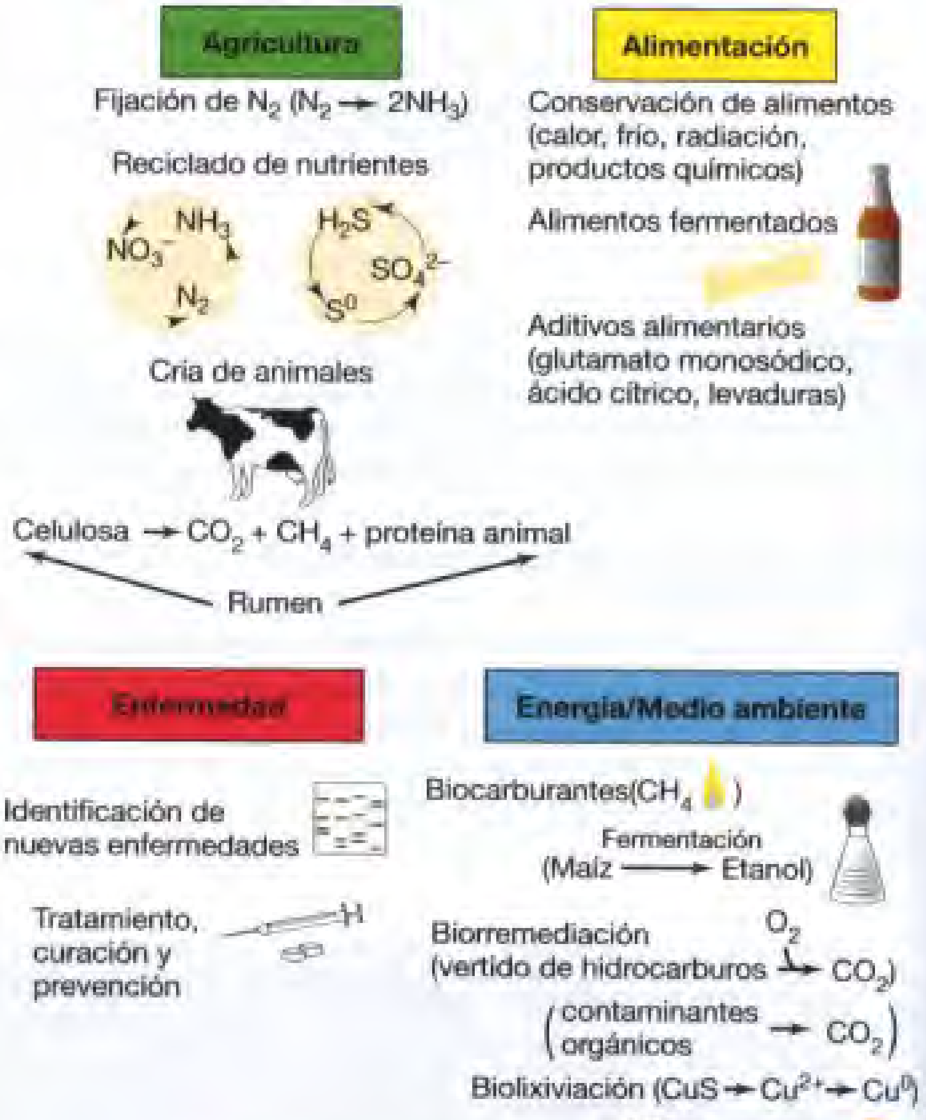
Como las células microbianas aisladas son demasiado pequeñas para observar a simple vista, el conocimiento de los microorganismos en la naturaleza comienza con estudios que utilizan el microscopio. El examen de materiales naturales, como el suelo o el agua, siempre pone de manifiesto la presencia de células microbianas. Aunque esas células tan diminutas pueden parecer triviales, son capaces de multiplicarse rápidamente y de producir grandes poblaciones que pueden tener un gran impacto en el hábitat. Así, pese a que los microorganismos pueden pasar por ser en la naturaleza componentes minoritarios, son parte muy importante de cada ecosistema. En posteriores capítulos, tras aprender algunos detalles de la estructura y función de los microorganismos, su genética, evolución y diversidad, reconsideraremos los modos mediante los cuales los microorganismos afectan a los animales, a las plantas y al ecosistema global en su conjunto.

La importancia de la vida microbiana

Resulta común suponer que como los microorganismos son tan pequeños, su biomasa en la Tierra también debe ser pequeña en comparación con la biomasa de organismos superiores. Sin embargo, esto no es probablemente cierto. Cálculos detallados sobre el número total de células microbianas en la Tierra, concretamente, sobre el número total de **procariotas** (también llamadas **bacterias**, células pequeñas que carecen de núcleo y sobre las que hablaremos con detalle en capítulos posteriores) indican que este número es del orden de 5×10^{30} células. La cantidad total de carbono que está presente en este número tan grande de células tan pequeñas equivale al de todas las plantas de la Tierra, mientras que el contenido total de nitrógeno y fósforo en estas células procarióticas es 10 veces mayor que la de toda la biomasa vegetal. Por tanto, las células procarióticas, por pequeñas que sean, *constituyen la mayor porción de biomasa sobre la Tierra* y son reservas de nutrientes esenciales para la vida. Es interesante señalar que la mayor parte de las células procarióticas no se encuentra en la superficie de la Tierra, sino en zonas bajo la superficie en los ambientes oceánicos y terrestres. Como estos hábitat están casi inexplorados, aún queda mucho por descubrir a fin de conocer y comprender las formas de vida que dominan la Tierra.

✓ 1.3 Revisión de conceptos

En la naturaleza, los microoganismos existen en poblaciones que interaccionan con otras poblaciones dentro de comunidades microbianas. Las actividades de estas comunidades microbianas pueden afectar de modo importante a las propiedades físicas y químicas de sus hábitat. La mayor parte de la biomasa de nuestro planeta es microbiana.



Agricultura
Fijación de N_2 ($N_2 \rightarrow 2NH_3$)
Reciclado de nutrientes
NH_3
NO_3^-
N_2
H_2S
SO_4^{2-}
S^0
Cría de animales
Celulosa $\rightarrow CO_2 + CH_4$ + proteína animal
Rumen
Alimentación
Conservación de alimentos (calor, frío, radiación, productos químicos)
Alimentos fermentados
Aditivos alimentarios (glutamato monosódico, ácido cítrico, levaduras)
Enfermedad
Identificación de nuevas enfermedades
Tratamiento, curación y prevención
Energía/Medio ambiente
Biocarburantes(CH_4)
Fermentación
(Maíz → Etanol)
Biorremediación
O_2
(vertido de hidrocarburos → CO_2)
(contaminantes orgánicos → CO_2)
Biolixiviación ($CuS \rightarrow Cu^{2+} \rightarrow Cu^0$)
Biotecnología
Organismos modificados genéticamente (→)
Obtención de productos farmacéuticos (insulina y otras proteínas humanas) (→)
Terapia génica para ciertas enfermedades
(persona enferma → lesión genética corregida)

Figura 1.6 Influencia de los microorganismos en la actividad humana. Aunque muchos sólo consideran a los microorganismos en el contexto de las enfermedades infecciosas, en realidad sólo unos cuantos causan enfermedades. Los microorganismos afectan a muchos aspectos de nuestras vidas además de ser agentes etiológicos de enfermedades.

- ✓ ¿Qué es un *hábitat microbiano*?
- ✓ ¿Cómo cambian los microorganismos las propiedades físicas y químicas de sus hábitat?
- ✓ ¿Dónde se localiza la mayor parte de las células procarióticas en la Tierra?

1.4 El impacto de los microorganismos sobre el hombre

Uno de los objetivos de los microbiólogos es comprender cómo trabajan los microorganismos y, a través de ese conocimiento, diseñar modos mediante los cuales su efecto beneficioso pueda ser aumentado y el perjudicial reducido. Los microbiólogos han tenido mucho éxito en conseguir estos fines y la microbiología ha sido muy importante en los avances de la salud humana y el bienestar. Una visión global del impacto de los microorganismos en las actividades humanas se muestra en la Figura 1.6

Los microorganismos como agentes etiológicos de enfermedades

Las cifras de la Figura 1.7, que comparan las causas actuales de muerte en Estados Unidos con las de hace 100 años, constituyen una estimación del éxito de los microbiólogos en cuanto al control de los microorganismos. Al comienzo del siglo XX las causas de muerte más frecuentes eran las enfermedades infecciosas; en la actualidad tales enfermedades son mucho menos importantes. El control de las enfermedades infecciosas se ha logrado por un conocimiento integrado de los procesos infecciosos, por la mejora de las prácticas sanitarias y por el descubrimiento y uso de los agentes antimicrobianos. Como trataremos más tarde en este capítulo, la microbiología tuvo sus principios como ciencia precisamente en estudios sobre enfermedades.

Sin embargo, aunque vivimos en un mundo donde muchos microorganismos patógenos están controlados, los microorganismos pueden ser todavía un riesgo importante para la supervivencia. Piénsese en los individuos que mueren lentamente por infecciones microbianas como resultado del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), en los pacientes de cáncer cuyo sistema inmune está dañado por la terapia anticancerosa o en individuos infectados por un patógeno con resistencia múltiple. Además, las enfermedades microbianas constituyen la principal causa de muerte en muchos países subdesarrollados. Aunque la erradicación de la viruela en el mundo ha sido un rotundo éxito para la medicina, aún mueren millones de personas al año por enfermedades microbianas tan difundidas como la malaria, la tuberculosis, el cólera, la enfermedad del sueño africana y síndromes diarreicos severos.

Por tanto, los microorganismos todavía constituyen serias amenazas para la existencia humana. No obstante, hay que destacar que la mayor parte de los microorganismos *no* son perjudiciales para el hombre. De hecho, la gran mayoría son en realidad *beneficiosos* y llevan a cabo procesos de enorme valor para la sociedad. A continuación, consideramos algunos de estos efectos favorables.

Microorganismos y agricultura

En general, nuestros sistemas de *agricultura* dependen en muchos aspectos de las actividades microbianas. Un gran número de cosechas se debe al cultivo de miembros de un grupo de plantas llamadas **leguminosas,** que viven en asociación muy estrecha con bacterias específicas que forman estructuras en sus raíces llamadas **nódulos**. En estos nódulos radiculares, el nitrógeno atmosférico (N_2) se convierte por fijación en compuestos nitrogenados que las plantas uti-

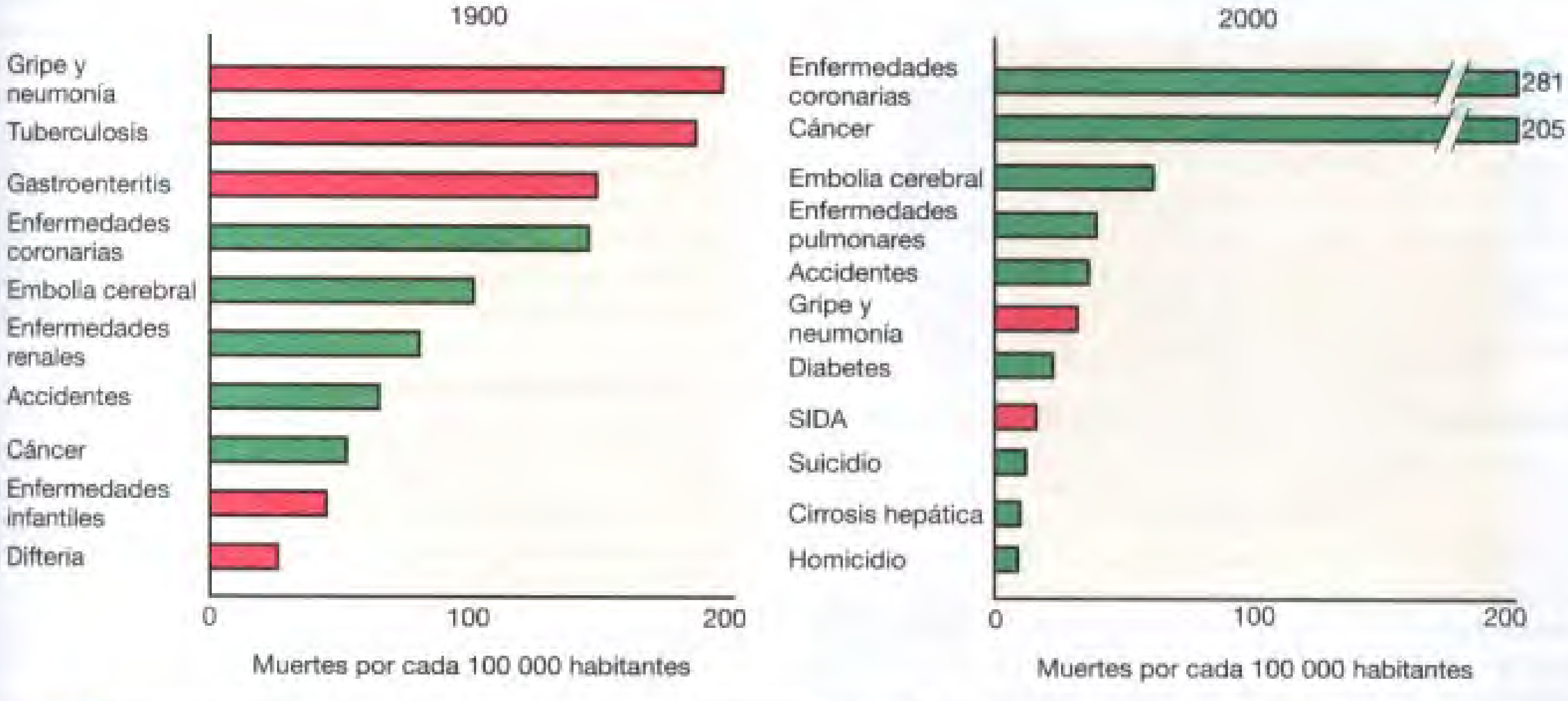


Figura 1.7 Frecuencia de las 10 causas más importantes de muerte en Estados Unidos en el año 1900 y en el año 2000. Las enfermedades infecciosas representaban las principales causas de muerte en 1900, pero hoy son mucho menos importantes. Las enfermedades microbianas se muestran en rojo y las de otros orígenes en verde. Datos tomados del Centro Nacional de Estadísticas de la Salud de Estados Unidos.

lizan para crecer. De este modo, las actividades de las bacterias contenidas en los nódulos de las raíces reducen la necesidad de fertilizantes costosos para plantas. También tienen gran importancia agrícola los microorganismos que son esenciales en el proceso digestivo de los rumiantes, como las vacas y las ovejas. Estos animales poseen un órgano digestivo especial llamado **rumen,** donde los microorganismos realizan el proceso digestivo. Sin estos microorganismos las vacas y las ovejas no podrían digerir su alimento y, por tanto, no podrían desarrollarse sobre sustancias tan pobres en nutrientes como la hierba o el heno. Los microorganismos también desempeñan funciones críticas en el reciclado de elementos importantes para la nutrición vegetal, en particular del carbono, nitrógeno y azufre. En el suelo y en el agua, los microorganismos convierten estos elementos en formas asimilables por las plantas. Además de beneficios, los microorganismos también acarrean perjuicios a la agricultura. Las enfermedades microbianas de animales y plantas tienen un importante impacto económico.

Microorganismos y alimentación

Una vez producidas las cosechas, productos agrícolas, o los animales en explotaciones ganaderas, éstos deben llegar a los consumidores con calidad sanitaria. De ahí que los microorganismos tengan una gran importancia en la *industria alimentaria.* El deterioro de los alimentos ocasiona anualmente pérdidas económicas inmensas. Las industrias de enlatado, congelado y desecado de alimentos tienen como finalidad preparar alimentos de tal modo que no sufran deterioro por microorganismos. Las *enfermedades* transmitidas por alimentos también son dignas de consideración. Los alimentos deben estar adecuadamente preparados y controlados para evitar la transmisión de enfermedades, ya que el alimento apto para el consumo humano puede servir también para sustentar el crecimiento de muchos microorganismos.

Sin embargo, no todos los microorganismos tiene efectos indeseables sobre los alimentos o sobre los consumidores. Por ejemplo, los productos lácteos que se manufacturan en gran medida gracias a actividades microbianas, tales como el queso, el yogurt o la mantequilla, son productos de gran valor económico. De modo similar, la col ácida, los pepinillos y algunas formas de salchichas deben también sus propiedades a los microorganismos. Los alimentos de panadería se elaboran usando levaduras. Las bebidas alcohólicas, ampliamente difundidas en nuestra sociedad, también son producidas por las levaduras. Muchos de estos temas se estudiarán en el Capítulo 30 de este libro.

Microorganismos, energía y medio ambiente

En lo que respecta a la energía, los microorganismos desempeñan funciones clave. La mayor parte del gas natural (metano) es un producto bacteriano, derivado de las actividades de las bacterias metanogénicas. Los microorganismos fototrofos pueden utilizar la luz como fuente de energía para la producción de **biomasa**, es decir, energía acumulada en forma de organismos vivos. La biomasa microbiana y los materiales de desecho, como la basura doméstica, los excedentes de cosechas y los residuos animales, se pueden convertir en «biocombustibles», como el metano y el etanol, por las actividades degradativas de los microorganismos.

Los microorganismos también se pueden usar para ayudar a eliminar la polución originada por las actividades humanas, un proceso que se denomina *biorremediación.* Se han aislado varios microorganismos de la naturaleza que consumen vertidos de petróleo, disolventes, pesticidas y otros productos tóxicos que contaminan el ambiente, bien sea directamente en el sitio del vertido o bien posteriormente, cuando el material tóxico ha penetrado en el suelo o alcanzado el agua subterránea. La enorme diversidad de los microorganismos en la Tierra permite disponer de grandes recursos genéticos que solucionen la limpieza del medio ambiente; éste es un área de intensa investigación en la actualidad.

Los microorganismos y el futuro

La **biotecnología** implica el uso de microorganismos en procesos industriales a gran escala, utilizando por lo general microorganismos modificados genéticamente y capaces de sintetizar productos específicos de elevado valor comercial (*véase* Capítulo 31).

La biotecnología depende en gran medida de la **ingeniería genética**, una disciplina que trata de la manipulación artificial de genes y de sus productos. Los genes procedentes de diversos organismos se pueden escindir en fragmentos y modificarlos utilizando enzimas microbianas como instrumentos moleculares. Mediante técnicas de ingeniería genética, resulta también posible hacer genes completamente artificiales. Una vez que un gen deseado se ha creado o seleccionado puede insertarse en un microorganismo y se puede expresar allí originando el producto génico deseado. Por ejemplo, la insulina humana, una hormona que se encuentra en cantidades anormalmente bajas en sujetos con diabetes, puede ser producida microbiológicamente a partir del gen de la insulina humana expresado en un microorganismo. Trataremos de la ingeniería genética y la biotecnología con cierto detalle en el Capítulo 31.

La abrumadora influencia de los microorganismos en la sociedad humana resulta clara. Tenemos muchas razones para considerar a los microorganismos y sus actividades (Figura 1.6). Como dijo uno de los fundadores de la microbiología, el eminente científico francés Louis Pasteur: «En la naturaleza, el papel de lo infinitamente pequeño es infinitamente grande». Antes de comenzar un estudio detallado de esta ciencia, consideremos brevemente las contribuciones que hicieron Pasteur y otros microbiólogos pioneros al desarrollo de la microbiología como ciencia.

✓ 1.4 Revisión de conceptos

Los microorganismos pueden ser tanto beneficiosos como perjudiciales para el hombre. Aunque tendemos a dar mayor importancia a los microorganismos perjudiciales (agentes etiológicos de enfermedades infecciosas), hay muchos más microorganismos beneficiosos que perjudiciales.

- ✓ ¿De qué modo son importantes los microorganismos en la industria agrícola y de los alimentos?
- ✓ ¿Qué combustibles pueden hacer los microorganismos?
- ✓ ¿Qué es la biotecnología y cómo puede mejorar la vida de los humanos?

II LOS CAMINOS DEL DESCUBRIMIENTO EN MICROBIOLOGÍA

Como cualquier ciencia, la microbiología moderna debe mucho a su pasado. Aunque se pueden encontrar raíces más profundas, la ciencia de la microbiología no se desarrolló hasta el siglo XIX. Desde entonces se ha extendido hasta originar nuevos campos relacionados entre sí. Ahora reconsideraremos algunos de los caminos que llevaron a importantes descubrimientos.

1.5 Raíces históricas de la microbiología

Aunque durante mucho tiempo se sospechó la existencia de criaturas demasiado pequeñas para ser percibidas a simple vista, su descubrimiento estuvo relacionado con la invención del microscopio. En 1664 Robert Hooke describió los cuerpos fructíferos de mohos (Figura 1.8), pero la primera persona que vió microorganismos con detalle fue el holandés Antonie van Leeuwenhoek, aficionado a construir microscopios, quien en 1684 utilizó microscopios simples fabricados por él mismo (Figura 1.9*a*). Comparados con los actuales, los microscopios de Leeuwenhoek eran bastante primitivos pero mediante una cuidadosa manipulación y un buen enfoque, fue capaz de ver microorganismos tan pequeños como los procariotas. Describió sus observaciones en una serie de cartas dirigidas a la Royal Society de Londres, publicadas en 1684 en inglés. En la Figura 1.9*b* se muestran dibujos de algunos de sus «diminutos animálculos». Sus observaciones fueron confirmadas por otros investigadores, pero los avances en la comprensión de la naturaleza e importancia de estos minúsculos seres fueron muy lentos. No fue hasta el siglo XIX cuando los microscopios fueron mejorados generalizándose su uso, lo que permitió poner de manifiesto el alcance y la naturaleza de las formas microbianas de vida.

Ferdinand Cohn y la ciencia de la bacteriología

La microbiología no se desarrolló como ciencia hasta que las mejoras en microscopía permitieron una mejor observación de las bacterias y se idearon técnicas básicas de laboratorio para el estudio de los microorganismos. El desarrollo de esas técnicas esenciales de laboratorio se vio favorecido por la investigación llevada a cabo durante el siglo XIX en torno a dos temas inquietantes. Uno de estos temas era la cuestión de la generación espontánea. Durante siglos, la idea de que la materia inerte podía originar seres vivos tuvo serios defensores. La segunda incógnita se centraba en la naturaleza de las enfermedades infecciosas. Se sabía que las enfermedades infecciosas se transmitían de un individuo a otro pero los mecanismos de la transmisión eran desconocidos. Aunque las respuestas a estas preguntas se suelen asociar con las figuras de Louis Pasteur y Robert Koch, respectivamente, fue el botánico alemán Ferdinand Cohn (1828-1898), un contemporáneo de aquéllos, quien fundó la bacteriología (el estudio de las bacterias) y colocó a la incipiente microbiología en un buen punto de partida.

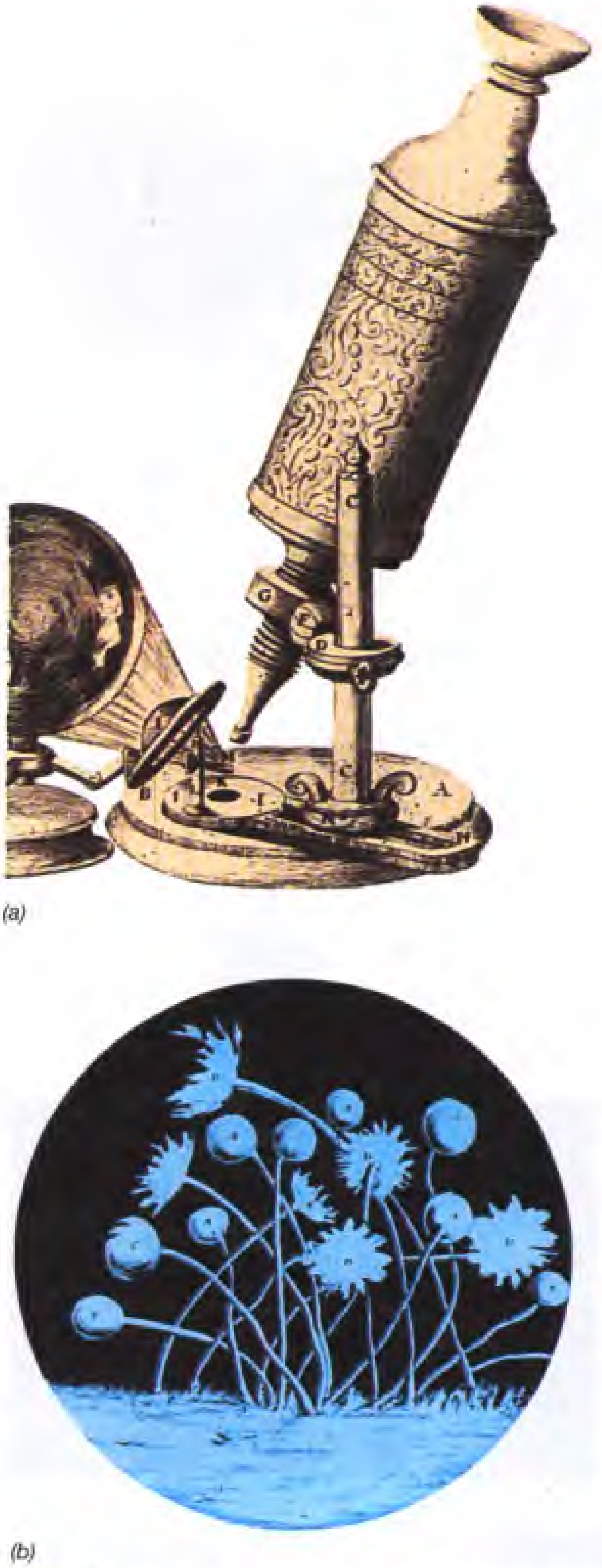


Figura 1.8 (a) Microscopio utilizado por Robert Hooke. La lente objetivo se encajaba al final de un fuelle ajustable (G) y la iluminación se concentraba en la muestra por una lente sencilla (1). (b) Dibujo de Robert Hooke que representa una de las primeras descripciones microscópicas de microorganismos: se trata de un moho azul creciendo en la superficie de un trozo de cuero; las estructuras redondeadas contienen las esporas del moho.

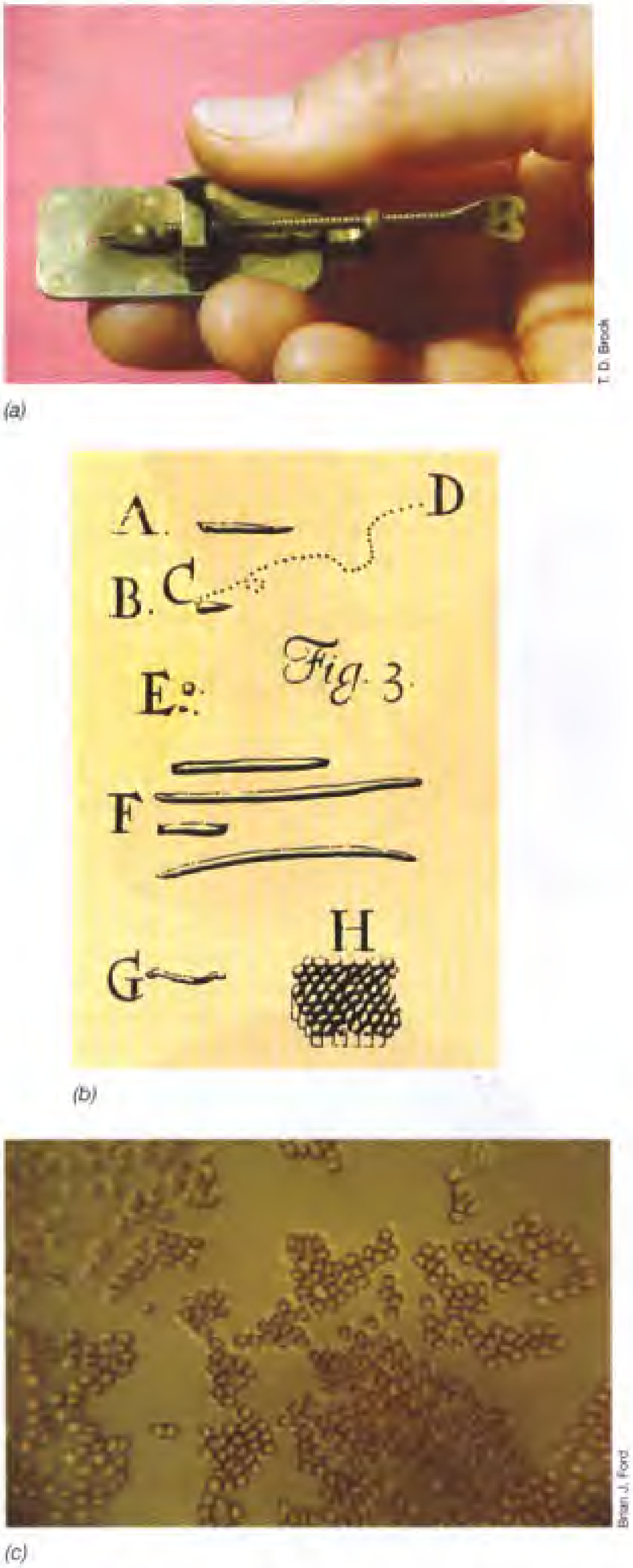


Figura 1.9 (a) Fotografía de una copia del microscopio de van Leeuwenhoek. La lente se montaba sobre la placa de latón cerca del extremo del tornillo ajustable de enfoque. (b) Dibujos de van Leeuwenhoek de bacterias publicados en 1684. En estos sencillos dibujos podemos reconocer varios tipos morfológicos de bacterias comunes. A, C, F y G, formas bacilares; E, formas esféricas o cocos; H, grupos de cocos. (c) Micrografía de una extensión de sangre humana vista a través de un microscopio de van Leeuwenhoek. Los glóbulos rojos se aprecian claramente.

Cohn nació en 1828 en la actual Wroclaw, Polonia. Se formó como botánico y hacia 1850 se interesó en la microscopía, teniendo la suerte de disponer de los mejores microscopios de su tiempo para estudiar el crecimiento y la división de células vegetales. Su interés por la microscopía le llevó primero al estudio de plantas unicelulares, las algas, y más tarde a bacterias fotosintéticas, las cianobacterias. Cohn pensaba que todas las bacterias, incluso aquellas que carecen de pigmentos fotosintéticos, eran miembros del reino vegetal y sus estudios de microscopía de plantas y algas derivaron gradualmente al estudio de diversas bacterias, como la bacteria oxidante del azufre *Beggiatoa* (Figura 1.10).

Cohn se interesó especialmente por las bacterias resistentes al calor, lo que le llevó a descubrir el género *Bacillus* y el proceso de formación de esporas. Ahora sabemos que las endosporas bacterianas son estructuras muy resistentes al calor, de hecho las más resistentes de todas las formas microbianas si exceptuamos unas pocas bacterias que crecen mejor a temperaturas notablemente elevadas. Cohn describió el ciclo de vida completo de *Bacillus* (célula vegetativa → endospora → célula vegetativa (*véase* Sección 4.15)) y descubrió que las células vegetativas, pero no las endosporas, podían morir mediante ebullición. Estos hallazgos de Cohn ayudaron a explicar por qué algunos científicos anteriores, como John Tyndall, observaron que la ebullición era a menudo una técnica efectiva de esterilización, pero no siempre era así.

Cohn continuó trabajando con bacterias hasta su retiro, contribuyendo de muchas maneras al desarrollo de la bacteriología, aportando las bases experimentales para un esquema de clasificación de las bacterias y fundando una importante revista científica. En su época, Cohn fue un entusiasta defensor de las técnicas y las investigaciones desarrolladas por el fundador de la microbiología médica Robert Koch. También se debe a Cohn haber ideado métodos simples y efectivos para evitar la contaminación de medios de cultivo estériles, como el uso del algodón para cerrar los tubos y los matraces. Estos métodos fueron usados posteriormente por Koch y le permitieron grandes avances como el aislamiento y la caracterización de varias bacterias causantes de enfermedades (*véase* más adelante en esta sección).

Pasteur y el fin de la generación espontánea

En el siglo XIX tuvo lugar una gran polémica sobre la teoría de la **generación espontánea**. La idea básica de la generación espontánea puede comprenderse fácilmente. El alimento se pudre si permanece durante cierto tiempo a la intemperie. Cuando este material putrefacto se examina al microscopio se encuentra que está repleto de bacterias. ¿De dónde provienen estas bacterias que no se ven en el alimento fresco? Algunos pensaban que provenían de semillas o gérmenes que llegaban al alimento a través del aire, mientras otros opinaban que se originaban espontáneamente a partir del material inerte.

El adversario más ferviente de la generación espontánea fue el químico francés Louis Pasteur (1822-1895), cuyo trabajo sobre este problema fue el más riguroso y convincente. En primer lugar, Pasteur demostró que en el aire

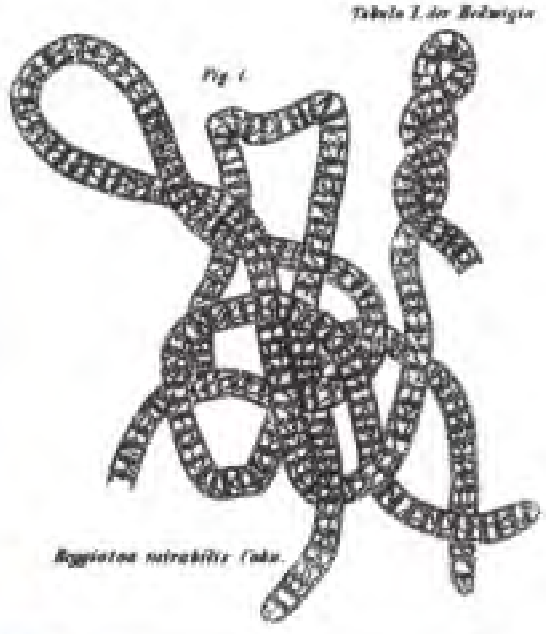


Fig. I
Beggiatoa mirabilis Cohn.

Figura 1.10 Dibujo realizado por Ferdinand Cohn en 1866 de la bacteria filamentosa oxidante de azufre *Beggiatoa mirabilis.* Los pequeños gránulos dentro de la célula son azufre elemental producido por la oxidación del sulfhídrico (H_2S). Cohn fue el primero en identificar estos gránulos como azufre.

había estructuras que se parecían mucho a los microorganismos encontrados en el material putrefacto. Descubrió que el aire normal contiene continuamente una diversidad de células microbianas que son indistinguibles de las que se encuentran en mucha mayor cantidad en los materiales en putrefacción. Por tanto, concluyó que los organismos encontrados en tales materiales se originaban a partir de microorganismos presentes en el aire. Además postuló que dichas células en suspensión se depositan constantemente sobre todos los objetos. Pasteur pensó que si sus conclusiones eran correctas, entonces no debería estropearse un alimento tratado, de tal modo que todos los organismos que lo contaminaran fueran destruidos.

Pasteur empleó el calor para eliminar los contaminantes, pues ya se sabía que el calor destruye con efectividad los organismos vivos. De hecho, otros investigadores ya habían mostrado que si una solución de nutrientes se introducía en un matraz de vidrio, se sellaba y se calentaba luego hasta ebullición, nunca se descomponía. Los defensores de la generación espontánea criticaban tales experimentos argumentando que se necesitaba aire fresco para la generación espontánea y que el aire dentro del matraz cerrado se modificaba por el calentamiento, de modo que no era capaz de permitir la generación espontánea. Pasteur superó esta objeción de modo simple y brillante construyendo un matraz con forma de cuello de cisne, que ahora se designa como un *matraz Pasteur* (Figura 1.11). En tales recipientes, las soluciones nutritivas se podían calentar hasta ebullición; luego, cuando el matraz se enfriaba, el aire podía entrar de nuevo, pero la curvatura del cuello del matraz evitaba que el material particulado, las bacterias y otros microorganismos, alcanzasen el interior del matraz. El material esterilizado en tal recipiente no se descomponía y no aparecían microorganismos mientras el cuello del matraz no contactara con el líquido estéril. Sin embargo, bastaba con que el matraz se inclinara lo suficiente como para permitir que el líquido estéril contactara con el cuello, para que ocurriera la putrefacción y el líquido se llenara de microorganismos. Este sencillo experimento bastó para aclarar definitivamente la controversia sobre la generación espontánea.

Eliminar todas las bacterias o microorganismos de un objeto es un proceso que ahora denominamos **esterilización**. Los procedimientos que usaron Pasteur, Cohn y otros investigadores fueron finalmente mejorados y aplicados a la investigación microbiológica. El fin de la teoría de la generación espontánea condujo, por tanto, al desarrollo de procedimientos eficaces de esterilización, sin los cuales la microbiología no podría haberse desarrollado como ciencia.

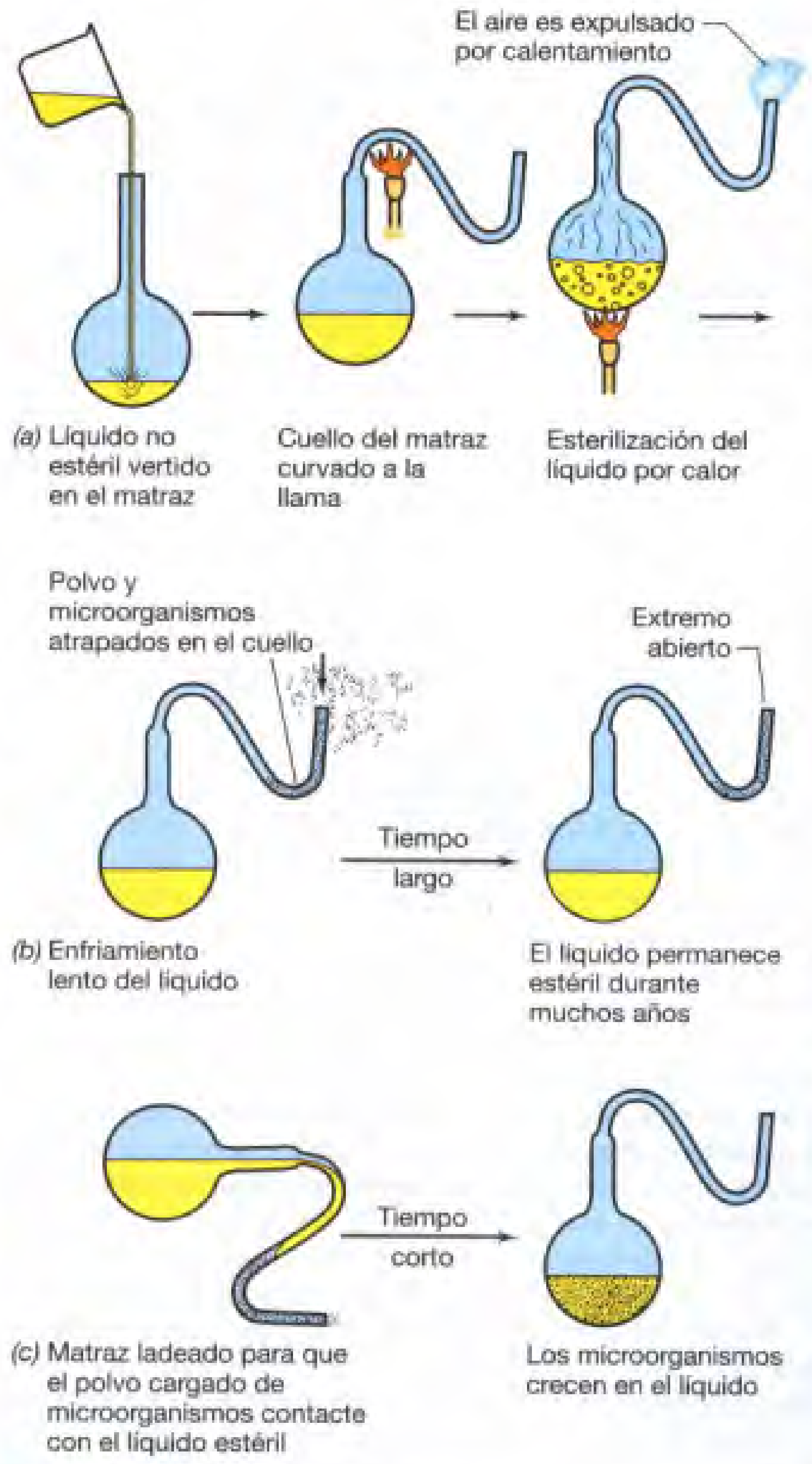

El aire es expulsado por calentamiento
(a) Líquido no estéril vertido en el matraz
Cuello del matraz curvado a la llama
Esterilización del líquido por calor
Polvo y microorganismos atrapados en el cuello
Extremo abierto
Tiempo largo
(b) Enfriamiento lento del líquido
El líquido permanece estéril durante muchos años
Tiempo corto
(c) Matraz ladeado para que el polvo cargado de microorganismos contacte con el líquido estéril
Los microorganismos crecen en el líquido

Figura 1.11 Experimento de Pasteur con matraces de cuello de cisne. (a) Esterilización del contenido del matraz. (b) Si el matraz se mantiene en posición vertical no hay crecimiento microbiano. (c) Si los microorganismos atrapados en el cuello alcanzan el líquido estéril, crecen rápidamente.

La ciencia de los alimentos, por otra parte, está en deuda con Pasteur pues sus principios son los que se utilizan en el envasado y conservación de muchos alimentos.

Pasteur consiguió muchos otros éxitos en microbiología y medicina. Entre los principales destaca el desarrollo de vacunas para enfermedades como el carbunco, el cólera aviar y la rabia, durante el periodo de 1880-1890. Estos avances médicos y veterinarios no sólo tuvieron importancia por sí mismos, sino que permitieron que arraigara el concepto de la *teoría microbiana de las enfermedades infecciosas*, cuyos principios estaban siendo desarrollados por entonces por otro científico contemporáneo de Pasteur, Robert Koch.

Koch y la teoría microbiana de las enfermedades infecciosas

La demostración de que los microorganismos podían causar enfermedades impulsó el desarrollo inicial de la ciencia de la microbiología. En realidad, ya en el siglo XIX se pensaba que se podía transmitir «algo» de una persona enferma a una sana, y producir en esta última la enfermedad de la primera. Muchas enfermedades parecían diseminarse por la población y se llamaban *contagiosas* mientras que el agente desconocido que causaba la diseminación fue llamado *contagio*. Tras el descubrimiento de los microorganismos, se sospechaba que éstos pudieran ser responsables de enfermedades, pero faltaban las pruebas definitivas. Los descubrimientos de Ignaz Semmelweis y Joseph Lister suministraron algunas pruebas indirectas sobre la importancia de los microorganismos como causa de enfermedades en el hombre, pero la *teoría microbiana de las enfermedades infecciosas* no fue claramente concebida y experimentalmente probada hasta los trabajos del médico Robert Koch (1843-1910).

En su trabajo inicial Koch estudió el carbunco, una enfermedad del ganado que en ocasiones también afecta al hombre. Esta enfermedad está causada por una bacteria formadora de endosporas, *Bacillus anthracis*, y la sangre de un animal con carbunco está llena de células de esta gran bacteria. Mediante cuidadosos estudios de microscopía, Koch puso de manifiesto que la bacteria estaba siempre presente en la sangre de los animales enfermos. Sin embargo, la mera asociación de la bacteria con la enfermedad no demostraba que la bacteria fuera la *causa* de la enfermedad; por el contrario, podría ser un *efecto* de la enfermedad. Por eso, Koch demostró que era posible tomar una pequeña cantidad de sangre de un ratón enfermo, inyectarla en un segundo ratón y provocar en éste la enfermedad y la muerte. Tomando sangre de este segundo animal e inyectándola en otro, obtenía de nuevo los síntomas característicos de la enfermedad.

Repitiendo experimentos de este tipo, Koch demostró por microscopía que la sangre del animal enfermo contenía gran cantidad de la bacteria formadora de endosporas.

Koch llevó este experimento aun más lejos. También demostró que la bacteria podía ser cultivada en caldos nutritivos fuera del animal y que, incluso después de muchas resiembras o transferencias de cultivo, la bacteria podía causar la enfermedad aún cuando se reinoculaba a un animal. Es decir, la bacteria procedente de un animal enfermo y la mantenida en cultivo inducían los mismos síntomas de enfermedad tras su inoculación. Basándose en éste y en otros experimentos, Koch formuló los siguientes criterios, conocidos en la actualidad como postulados de Koch, para demostrar que un tipo concreto de microorganismo es el agente etiológico de una enfermedad específica.

Postulados de Koch

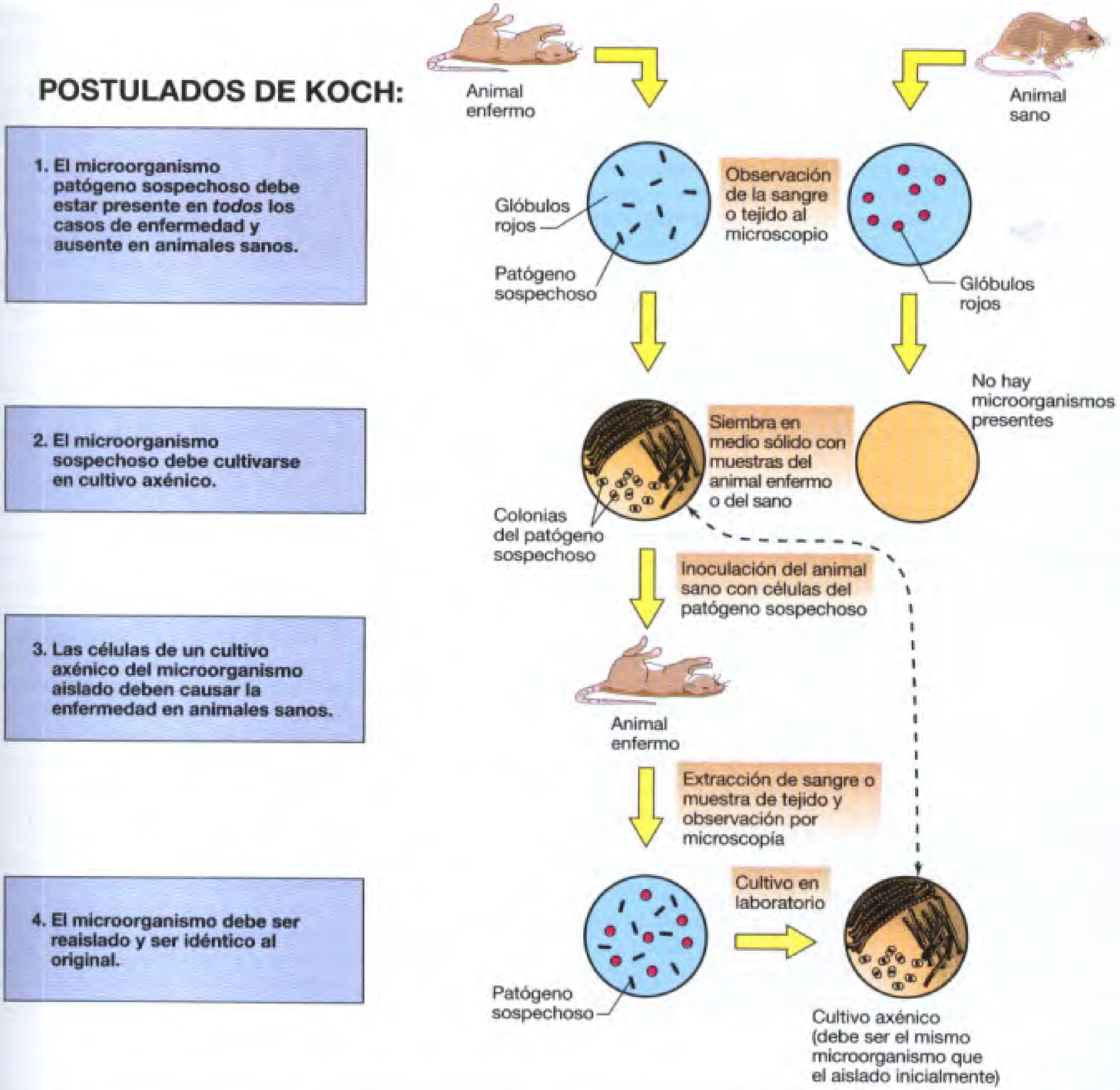
1. El organismo debe estar siempre presente en los animales que sufran la enfermedad y no en individuos sanos.
2. El organismo debe cultivarse en cultivo axénico o puro fuera del cuerpo del animal.
3. Cuando dicho cultivo se inocula a un animal susceptible, debe iniciar en él los síntomas característicos de la enfermedad.
4. El organismo debe aislarse nuevamente de estos animales experimentales y cultivarse nuevamente en el laboratorio, tras lo cual debe mostrar las mismas propiedades que el microorganismo original.

Los postulados de Koch se resumen en la Figura1.12. Estos postulados no sólo permitieron demostrar que organismos específicos originan enfermedades específicas, sino que impulsaron el desarrollo de la microbiología haciendo hincapié en la importancia de la utilización de los cultivos en laboratorio. Usando estos postulados como guía, otros investigadores revelaron posteriormente la causa de muchas enfermedades importantes del hombre y de los animales. A su vez, estos descubrimientos condujeron al establecimiento de tratamientos adecuados para la prevención y cura de muchas enfermedades infecciosas, ampliándose de este modo las bases científicas de la medicina clínica.

Koch y los cultivos puros

Para relacionar un microorganismo determinado con un proceso específico, como el caso de una enfermedad, el microorganismo debe ser primero aislado en un cultivo; es decir, el cultivo debe de ser *axénico* o *puro*. Este concepto fue recogido por Koch en la formulación de sus famosos postulados (Figura 1.12) y desarrolló varios métodos ingeniosos para obtener bacterias en cultivo puro (*véase* recuadro sobre medios sólidos, las placas de Petri y los cultivos puros).

Koch empezó estos estudios de forma rudimentaria, usando nutrientes sólidos como la superficie de una rebanada de patata para cultivar bacterias, pero pronto diseñó métodos más fiables, muchos de los cuales aún se usan en la actualidad. Koch observó que cuando se exponía al aire la superficie de un nutriente sólido se desarrollaban colonias bacterianas que tenían formas y colores característicos. Dedujo que cada colonia se originaba a partir de una sola célula bacteriana que había caído sobre la superficie, había encontrado los nutrientes apropiados y se había multiplicado; es decir, cada colonia representaba un *cultivo axénico* o *puro*. Koch se dio cuenta de que este descubrimiento suponía un sencillo procedimiento para obtener cultivos puros. Como muchos organismos no crecen en rebanadas de patata, Koch ideó caldos nutritivos más uniformes y



POSTULADOS DE KOCH:

1. **El microorganismo patógeno sospechoso debe estar presente en *todos* los casos de enfermedad y ausente en animales sanos.**
2. **El microorganismo sospechoso debe cultivarse en cultivo axénico.**
3. **Las células de un cultivo axénico del microorganismo aislado deben causar la enfermedad en animales sanos.**
4. **El microorganismo debe ser reaislado y ser idéntico al original.**

Animal enfermo
Animal sano
Glóbulos rojos
Patógeno sospechoso
Observación de la sangre o tejido al microscopio
Glóbulos rojos
No hay microorganismos presentes
Siembra en medio sólido con muestras del animal enfermo o del sano
Colonias del patógeno sospechoso
Inoculación del animal sano con células del patógeno sospechoso
Animal enfermo
Extracción de sangre o muestra de tejido y observación por microscopía
Cultivo en laboratorio
Patógeno sospechoso
Cultivo axénico (debe ser el mismo microorganismo que el aislado inicialmente)

Figura 1.12 Los postulados de Koch para demostrar que un determinado microorganismo causa una enfermedad específica. Es esencial que tras el aislamiento en cultivo axénico o puro del microorganismo sospechoso, un cultivo en el laboratorio de dicho microorganismo sea capaz de producir la enfermedad y pueda ser recuperado del animal enfermo. Es necesario determinar las condiciones apropiadas para que el microorganismo sea capaz de crecer, pues de otro modo no podrá ser aislado.

reproducibles solidificados con gelatina y más tarde con agar (*véase* recuadro). Actualmente el agar es el agente solidificante más usado en los laboratorios de microbiología para obtener y mantener cultivos puros de muchos microorganismos, especialmente de bacterias.

Koch y la tuberculosis

El mayor logro de Koch en la bacteriología médica está relacionado con la tuberculosis. Cuando Koch comenzó este estudio (1881), una de cada siete muertes en humanos era debida a la tuberculosis. Aunque en aquel tiempo se sospechaba que la tuberculosis era una enfermedad contagiosa, el organismo responsable de la enfermedad no se había visto, ni en los tejidos de enfermo ni en cultivo. Desde el principio de su estudio sobre la tuberculosis, el objetivo de Koch fue detectar el agente causante de la enfermedad y para ello empleó todos los métodos que había desarrollado previamente: microscopía, tinción de tejidos, aislamiento en cultivo puro e inoculación en animales.

Como sabemos ahora, el «bacilo de la tuberculosis», *Mycobacterium tuberculosis*, es muy difícil de teñir debido a que posee grandes cantidades de lípidos en su superficie. Pero Koch diseñó un procedimiento para teñir *M. tuberculosis* en muestras de tejidos usando azul de metileno alcalino y un segundo colorante (marrón Bismark) que teñía sólo el tejido. El método de Koch fue el precursor de la tinción de Ziehl-Nielsen usada hoy para teñir bacterias ácido-alcohol resistentes como *M. tuberculosis* (*véase* Sección 12.24). Usando su nuevo método de tinción, Koch observó las células bacilares de *M. tuberculosis* teñidas de azul en tejidos tuberculosos, quedando estos últimos teñidos de marrón claro (Figura 1.13). Sin embargo, por su trabajo anterior sobre el carbunco, Koch era consciente de que *identificar* un microorganismo asociado a la tuberculosis no bastaba; debía *cultivar* el microorganismo para demostrar que era la causa específica de la tuberculosis.

La obtención de cultivos de *M. tuberculosis* no fue tarea fácil, pero finalmente Koch tuvo éxito al obtener colonias de este organismo sobre suero de sangre coagulada. Posteriormente usó agar, que acababa de ser introducido como agente solidificante (*véase* recuadro). En condiciones óptimas, *M. tuberculosis* crece muy lentamente en cultivo pero la paciencia y persistencia de Koch hicieron posible la obtención de cultivos puros de este organismo a partir de diversas fuentes de origen humano y animal. Más tarde, fue relativamente sencillo obtener la prueba definitiva de que el organismo aislado era la verdadera causa de la tuberculosis. Los cobayas pueden ser infectados fácilmente con *M. tuberculosis* y posteriormente mueren de tuberculosis sistémica. Koch demostró que los cobayas enfermos contenían masas celulares de *M. tuberculosis* en sus tejidos y que los cultivos puros obtenidos de dichos animales transmitían la enfermedad a animales sanos. Koch, por tanto, cumplió los cuatro criterios de sus postulados y estableció la causa de la tuberculosis (Figura 1.12). Por esta importante contribución, Robert Koch recibió en 1905 el premio Nobel de fisiología y medicina.

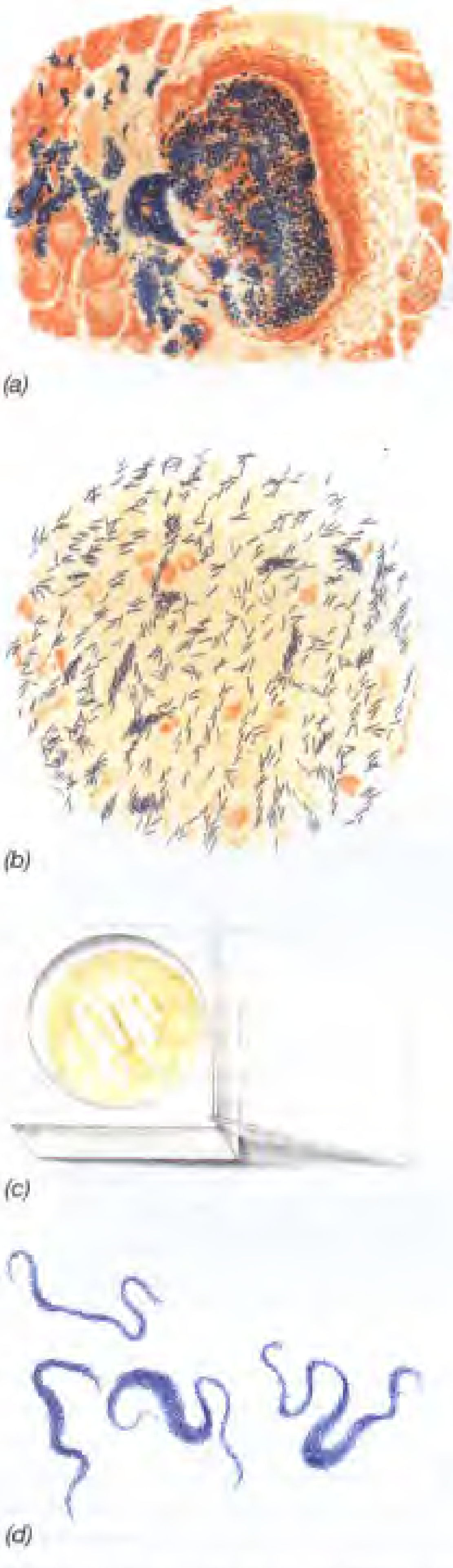


Figura 1.13 Dibujos de Robert Koch de células de *Mycobacterium tuberculosis* en tejidos y en cultivo de laboratorio. (a) Sección transversal de un tubérculo en tejido pulmonar. Las células de *M. tuberculosis* se tiñen de azul mientras que el tejido pulmonar se tiñe de marrón. (b) Células de *M. tuberculosis* en una muestra de esputo de un paciente tuberculoso. (c, d) Crecimiento de *M. tuberculosis* en cultivo puro. (c) Crecimiento en una placa de vidrio con suero sanguíneo coagulado en su interior y la tapadera abierta. (d) Se tomó una colonia de células de *M. tuberculosis* de la placa (c) y se observó al microscopio a 700 aumentos (700x); las células aparecen formando largas «cuerdas» (compárese con la Figura 12.70*b*). Los dibujos originales aparecieron en Koch, R. 1884 «Die Aetiologie der Tuberkulose». *Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte* 2:1-88.

✓ 1.5 Revisión de conceptos

Ferdinand Cohn fundó la bacteriología y descubrió las endosporas bacterianas. El trabajo de Louis Pasteur sobre la generación espontánea condujo al desarrollo de métodos para el control del crecimiento de los microorganismos. Robert Koch estableció los criterios para el estudio de los microorganismos infecciosos y desarrolló los primeros métodos para el cultivo axénico o puro de los microorganismos.

✓ ¿De qué manera el famoso experimento de Pasteur puso fin a la teoría de la generación espontánea?

✓ ¿Cómo se puede probar con los postulados de Koch la causa y efecto en una enfermedad?

✓ ¿Qué ventajas tienen los medios sólidos para el cultivo de microorganismos?

Aprendiendo del pasado

Medios sólidos, la placa de Petri y los cultivos puros

Robert Koch fue el primero que cultivó bacterias en medios de cultivo sólidos. Inicialmente, Koch empleó gelatina como agente para solidificar los diversos caldos nutritivos que usaba para cultivar bacterias patógenas; y desarrolló un método para preparar láminas horizontales de un medio sólido que mantenía libre de contaminantes cubriéndolas con una campana o tapadera de cristal (*véase* Figura 1.13*c*).

Los caldos nutritivos con gelatina constituían un buen medio de cultivo para el aislamiento y estudio de varias bacterias, pero presentaba varios inconvenientes, el más importante era que la gelatina no se mantenía sólida a la temperatura del cuerpo humano (37°C), temperatura óptima para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos patógenos humanos. Por tanto, se necesitaba un agente solidificante más versátil y éste resultó ser el agar.

El agar es un polisacárido derivado de algas rojas. En el siglo XIX se usaba con frecuencia, especialmente en países tropicales en la preparación de geles. El primer uso del agar como agente solidificante en medios de cultivo bacteriológicos se debe a Walter Hesse. La idea real de que el agar podía ser usado en lugar de la gelatina fue sugerida por la mujer de Hesse, Fannie Hesse, quien había usado el agar para la preparación de mermeladas de fruta. Cuando se ensayó como agente solidificante en medios de cultivo, se apreció que superaba a la gelatina en muchos aspectos. Hesse escribió a Koch acerca de este descubrimiento, y Koch adoptó rápidamente esta técnica en sus propios trabajos, como los estudios clásicos sobre el aislamiento de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico de la tuberculosis (*véanse* el texto y Figura 1.13).

En 1887 Richard Petri publicó un corto trabajo describiendo una modificación de la técnica de las láminas horizontales de Koch. La mejora de Petri, que resultó ser enormemente útil, consistía en el uso de las cajas o placas dobles circulares que llevan su nombre. Las ventajas de las placas de Petri eran evidentes: podían ser fácilmente almacenadas y esterilizadas independientemente del medio y, después de añadir el medio líquido fundido a la más pequeña de las dos tapaderas circulares, la de tamaño mayor podía utilizarse como tapadera para evitar contaminaciones. Las colonias que se formaban en la superficie del agar contenido en la placa de Petri quedaban expuestas al aire y podían ser fácilmente manipuladas para su estudio. La idea original de Petri no ha sido superada hasta la fecha, y las placas de Petri, ya sean de vidrio reutilizable y esterilizadas por calor seco, o de plástico desechable y esterilizadas por óxido de etileno (un esterilizante gaseoso) o por radiaciones gamma, constituyen el principal apoyo del laboratorio microbiológico.

Debe destacarse, finalmente, que Koch fue consciente de las implicaciones de sus métodos de obtención de cultivos puros en relación con el estudio de la sistemática bacteriana. Observó que sobre el medio sólido expuesto a un objeto contaminado se desarrollaban colonias con formas diferentes (diferían en color, forma, tamaño u otros caracteres) y que tales colonias se podían perpetuar y diferenciar entre sí por sus características particulares. Las células de diferentes colonias diferían microscópicamente y a menudo también en sus temperaturas óptimas de crecimiento o en sus requerimientos nutricionales. Koch se dio cuenta de que todas estas diferencias entre los microorganismos equivalían a los criterios que los taxonomistas habían establecido para la clasificación de los organismos superiores como animales y plantas. En palabras de Koch: «*Toda bacteria que mantenga las características que la diferencian de otras, cuando se cultivan en el mismo medio y bajo las mismas condiciones, debería ser designada como especie, variedad, forma o cualquier otra designación adecuada*». Koch también dedujo de sus estudios sobre cultivos puros que se podía demostrar que determinados organismos tenían efectos específicos. Tales ideas fueron muy importantes para la rápida aceptación de la microbiología como una ciencia biológica independiente.

El descubrimiento por Koch del medio de cultivo sólido y su importancia en la obtención de cultivos puros tuvo influencias más allá del ámbito de la bacteriología médica. Sus aportaciones constituyeron los instrumentos necesarios para el desarrollo de campos como el de la taxonomía bacteriana, la genética y otras disciplinas relacionadas. En conjunto, toda la microbiología tiene una enorme deuda de gratitud con Koch y sus colaboradores por su intuición al darse cuenta de la gran importancia de los cultivos puros y por desarrollar algunos de los métodos fundamentales en microbiología. ■

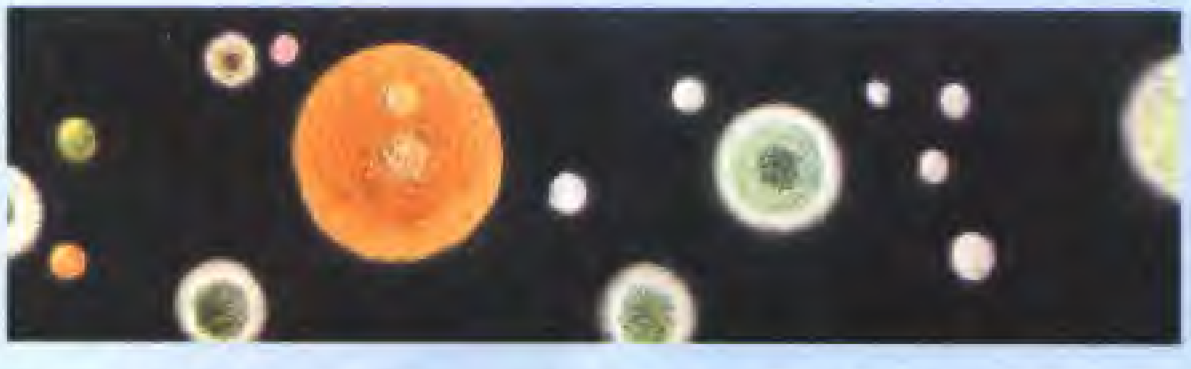


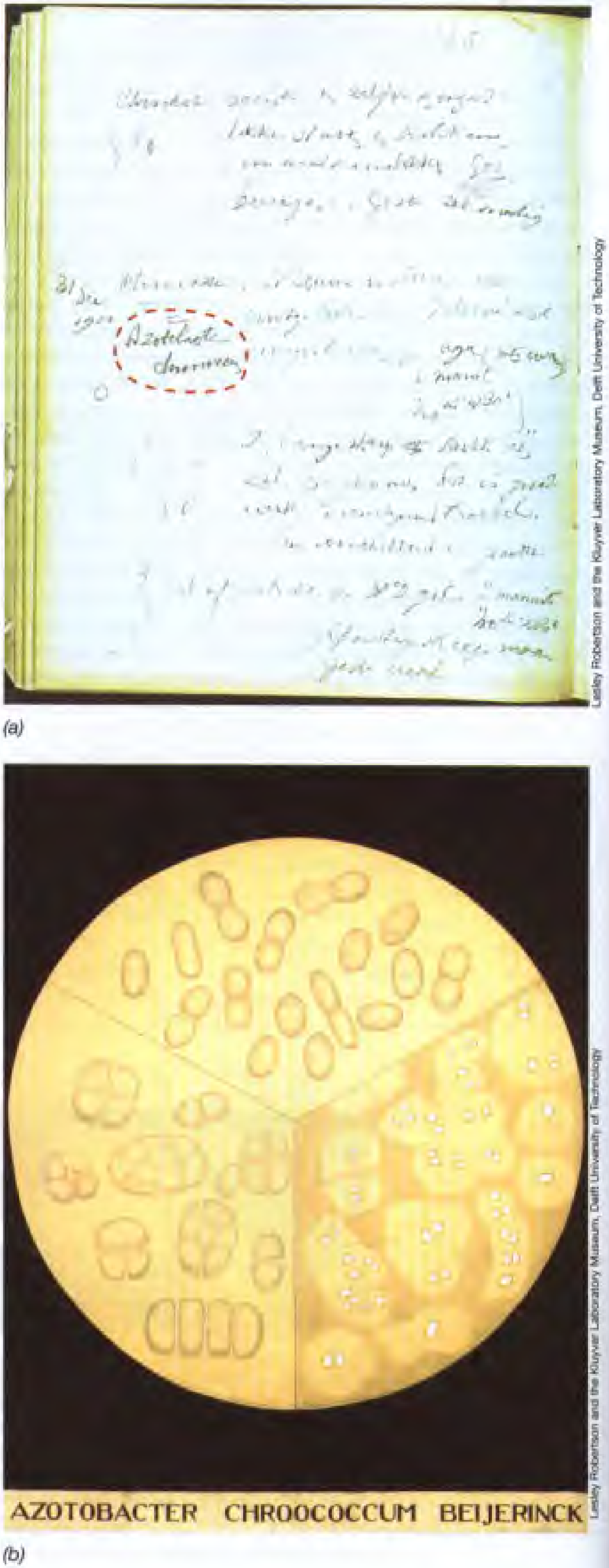
Figura 1 Fotografía coloreada a mano de colonias formadas sobre agar, realizada por Walter Hesse, un colaborador de Robert Koch. Las colonias corresponden a hongos (mohos) y bacterias que se obtuvieron en estudios iniciados por Hesse sobre el contenido microbiológico del aire de Berlín, Alemania, en 1882. Tomado de Hesse, W. 1884 «Ueber quantitative Bestimmung der in der Luft enthaltenen Mikroorganismen», en Struck (*ed.*), *Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte.* August Hirschwald.

1.6 Diversidad microbiana y nacimiento de la microbiología molecular

A medida que la microbiología progresó desde el siglo XIX al siglo XX, nuestro conocimiento sobre la diversidad microbiana aumentó de forma significativa y surgieron varias subdisciplinas en el área de la microbiología hasta llegar a la actual era de la «microbiología molecular». Merecen destacarse dos figuras importantes que hicieron posible esta transición, el holandés Martinus Beijerink y el ruso Sergei Winogradsky. Ambos microbiólogos pioneros se centraron en el estudio de las bacterias del suelo y del agua, y ambos destacaron principalmente por sus contribuciones al conocimiento de la diversidad microbiana.

Beijerinck y Winogradsky

En sus últimos años, Martinus Beijerinck (1851-1931) fue profesor de la Escuela Politécnica de Delft (de donde van Leeuvenhoek era también originario). En sus inicios tuvo una formación botánica y llegó a la microbiología a través del estudio de la microbiología de las plantas. La aportación más importante de Beijerinck al campo de la microbiología fue tal vez la formulación del concepto de **cultivo de enriquecimiento**. En vez de aislar microorganismos de la naturaleza de un modo no selectivo, Beijerinck propuso *seleccionar* microorganismos específicos a partir de muestras naturales mediante el uso de medios de cultivo específicos y condiciones de incubación que favorecieran el crecimiento de un sólo tipo o grupo de microorganismos relacionados fisiológicamente. Usando la técnica de cultivos de enriquecimiento (o de «cultivos selectivos», como él la denominó), Beijerinck aisló los primeros cultivos puros de muchos microorganismos del suelo y del agua, entre ellos bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno (Figura 1.14), bacterias reductoras de sulfato y oxidantes del azufre, bacterias fijadoras de nitrógeno en los nódulos radiculares, especies de *Lactobacillus*, algas verdes y muchos otros microorganismos. En sus estudios sobre la enfermedad del mosaico en el tabaco puso de manifiesto, mediante el uso de técnicas de filtración selectiva, que el agente infeccioso (un virus) no era una bacteria sino algo que se incorporaba en las células de la planta y necesitaba que ésta estuviera viva para reproducirse; en resumen, Beijerinck describió los principios básicos de la virología.



Lesley Robertson and the Kluyver Laboratory Museum, Delft University of Technology

Lesley Robertson and the Kluyver Laboratory Museum, Delft University of Technology

Figura 1.14 Martinus Beijerinck y *Azotobacter*. (a) Una página del cuaderno de notas de laboratorio de M. Beijerinck fechada el 31 de diciembre de 1900 que describe sus observaciones sobre la bacteria aerobia fijadora de nitrógeno *Azotobacter chroococcum* (rodeada en rojo). En esta página, Beijerinck usa el nombre de esta bacteria por vez primera. Compare el dibujo de Beijerinck de pares de células de *A. chroococcum* con la micrografía de células de *Azotobacter* que se presenta en la Figura 12.19a. (b) Dibujo realizado por la hermana de Beijerinck, Henriette Beijerinck, mostrando células de *Azotobacter chroococcum*. Beijerinck utilizó estos dibujos para ilustrar sus clases en tiempos muy anteriores a la aparición de las transparencias, las diapositivas y los cañones de proyección con computadora que se usan hoy en día.

Sergei Winogradsky (1856-1953), como Beijerinck, también logró aislar con éxito varias bacterias importantes por vez primera. Winogradsky estudió bacterias del suelo, en particular las implicadas en los ciclos del nitrógeno y del azufre (Figura 1.15). En este contexto, aisló cultivos puros de bacterias nitrificantes demostrando que el proceso de nitrificación (oxidación del amoníaco a nitrato) era consecuencia de la acción bacteriana, y estudió la oxidación directa del sulfhídrico por bacterias oxidantes del azufre en sus hábitat naturales.

Además de demostrar que las bacterias pueden ser agentes biogeoquímicos, el mérito de Winogradsky está en su aguda intuición de la *repercusión metabólica* de estos procesos. Por ejemplo, a lo largo de sus estudios sobre las bacterias que oxidan el azufre Winogradsky postuló el concepto de *quimiolitotrofía*, es decir, la oxidación de compuestos *inorgánicos* acoplada a la liberación de energía utilizable (*véanse* Secciones 2.4, 5.14 y 17.8). Además, estudiando las bacterias nitrificantes llegó a la conclusión de que estos organismos obtenían su carbono del CO_2 del aire, es decir, que eran *autótrofos*. Aunque por entonces ninguno de estos conceptos se aceptó con facilidad, hoy sabemos que la quimiolitotrofía y la autotrofía bacteriana son procesos muy importantes en la Tierra e incluso permiten el crecimiento de los organismos superiores (*véase* Sección 19.8). Usando un método de enriquecimiento, Winogradsky también aisló la primera bacteria fijadora de nitrógeno (la bacteria anaeróbica *Clostridium pasteurianum*) y desarrolló el concepto de fijación bacteriana de N_2. Winogradsky llegó a ser casi centenario y publicó numerosos trabajos junto con una importante monografía *Microbiologie du Sol* (Microbiología del Suelo); este último trabajo, verdadero hito en la historia de la microbiología, contenía dibujos originales de muchos de los microorganismos que había aislado y estudiado en cultivos de enriquecimiento o en materiales naturales a lo largo de su carrera (Figura 1.15).

La Tabla 1.1 muestra un resumen de algunos de los más importantes descubrimientos en el campo de la microbiología, desde la época de van Leeuwenhoek hasta nuestros días.

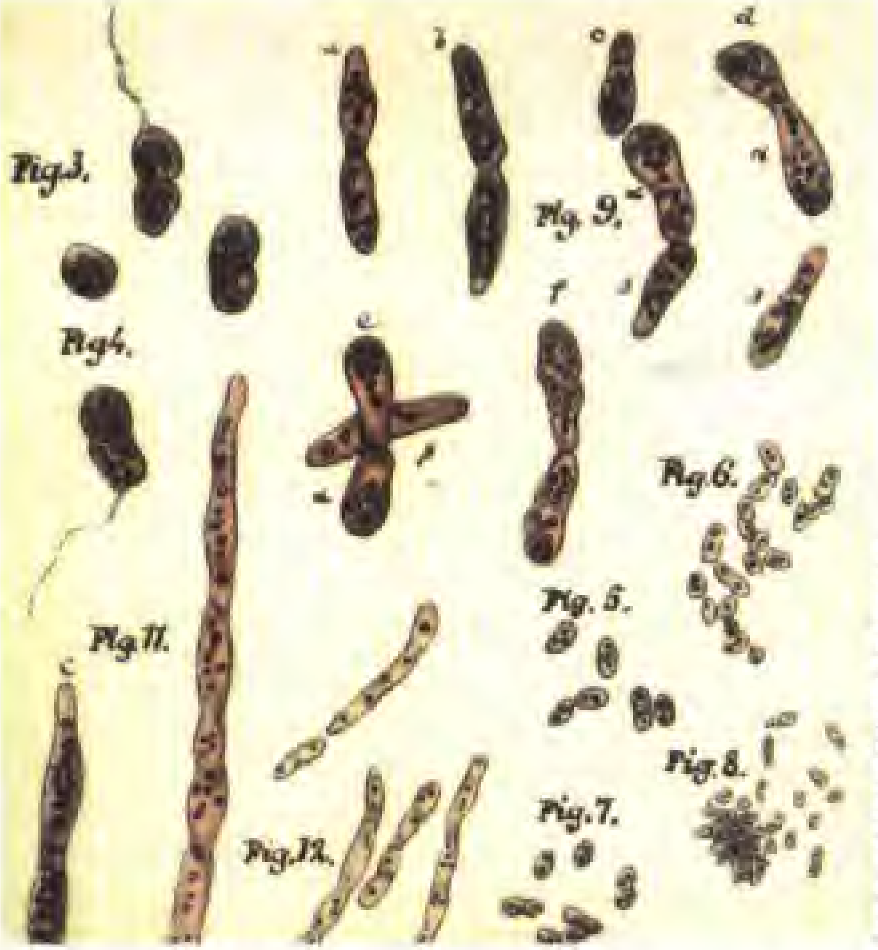


Fig.3.
Fig.4.
Fig.9.
Fig.6.
Fig.5.
Fig.11.
Fig.8.
Fig.7.
Fig.12.
a
b
c
d
e
f

From Microbiologie du Sol, used with permission

Figura 1.15 Dibujos coloreados a mano de células de bacterias fotosintéticas rojas del azufre incluidas en la monografía *Microbiologie du Sol*, de Sergei Winogradsky. Los dibujos originales fueron hechos por él mismo en 1887 y luego copiados y coloreados a mano por su esposa Helena para su publicación en la monografía. Estos dibujos muestran células del género *Chromatium*, como *C. kenii* (Figuras 3 y 4) y *C. vinosum* (Figuras 5-8). Estas especies aún se reconocen hoy. Nótense los prominentes flagelos de las células de *C. okenii*. Compare las Figuras 3 y 4 con la micrografía de células vivas de *C. okenii* que aparece en la Figura 12.4a de este libro. De Sergei Winogradsky, *Microbiologie du Sol*, fragmento de la Lámina IV. París, Francia: Masson et Cie Editeurs, 1949. Reproducida con permiso de Dunod Editeur, París, Francia.

Desarrollo de las subdisciplinas más importantes de la microbiología

Durante el siglo XX la microbiología experimentó un rápido desarrollo en dos direcciones distintas, una básica y otra aplicada. En su aspecto aplicado, los progresos de Koch condujeron a una expansión de la *microbiología médica* y la *inmunología* en la primera parte del siglo, con el descubrimiento de muchas bacterias patógenas nuevas (*véase* Descubridores de las principales bacterias patógenas, Capítulo 26) y el establecimiento de los principios por los que estos patógenos infectan el cuerpo y se hacen resistentes a sus defensas. Otros avances prácticos se registraron en el campo de la *microbiología agrícola*, impulsados por los descubrimientos de Beijerinck y Winogradsky, y ayudaron a comprender los procesos microbianos que en el suelo son beneficiosos o perjudiciales para el crecimiento de las plantas. Posteriormente, los estudios sobre microbiología del suelo aportaron descubrimientos sobre usos importantes de los microorganismos, tales como la síntesis de antibióticos y productos industriales. Esto abrió el campo de la *microbiología industrial*, especialmente tras la Segunda Guerra Mundial.

La microbiología del suelo también constituyó una base sólida para el estudio de los procesos microbianos que ocurren en medios acuáticos tales como lagos, ríos y océanos, estudios que se agrupan en el área de la *microbiología acuática*. Una rama de la microbiología acuática se centra en los procesos de tratamiento de aguas residuales y en el suministro de agua potable para el consumo humano. Se han desarrollado procesos que se utilizan para eliminar las bacetrias patógenas del agua y potabilizarla. A medida que fue creciendo el interés por la biodiversidad y por las actividades de los microorganismos fue surgiendo la *ecología microbiana* como una disciplina importante de la ciencia de la microbiología; ciencia que está experimentando una segunda «edad de oro» en la actualidad (*véanse* Capítulos 18 y 19).

TABLA 1.1 Trescientos años de microbiología: algunos trabajos clave en microbiología, 1684–2000[a]

Año	Investigador (es)	Descubrimiento
1684	Antoni van Leeuwenhoek	Descubrimiento de las bacterias
1798	Edward Jenner	Vacunación contra la viruela
1857	Louis Pasteur	Microbiología de la fermentación láctica
1860	Louis Pasteur	Función de las levaduras en la fermentación alcohólica
1864	Louis Pasteur	Fin de la controversia sobre la generación espontánea
1867	Robert Lister	Principios antisépticos en cirugía
1876	Ferdinand Cohn	Descubrimiento de las endosporas
1881	Robert Koch	Métodos de estudio de bacterias en cultivo axénico
1882	Robert Koch	Descubrimiento de la etiología de la tuberculosis
1882	Élie Metchnikoff	Fagocitosis
1884	Robert Koch	Postulados de Koch
1884	Christian Gram	Método de la tinción de Gram
1885	Louis Pasteur	Vacuna contra la rabia
1889	Sergei Winogradsky	Concepto de quimiolitotrofía
1889	Martinus Beijerinck	Concepto de virus
1890	Emil von Behring and Shibasaburo Kitasato	Antitoxina diftérica
1890	Sergei Winogradsky	Crecimiento autotrófico de los quimiolitotrofos
1901	Martinus Beijerinck	Método de cultivos de enriquecimiento
1901	Karl Landsteiner	Grupos sanguíneos humanos
1908	Paul Ehrlich	Agentes quimioterapéuticos
1911	Francis Rous	Primer virus oncogénico
1928	Frederick Griffith	Descubrimiento de la transformación en neumococos
1929	Alexander Fleming	Descubrimiento de la penicilina
1931	Cornelius van Niel	H_2S (sulfuro) como donador de electrones en la fotosíntesis anoxigénica
1935	Gerhard Domagk	Sulfamidas
1935	Wendall Stanley	Cristalización del virus del mosaico del tabaco
1941	George Beadle and Edward Tatum	Hipótesis un gen–una enzima
1943	Max Delbruck and Salvador Luria	Herencia de caracteres genéticos en bacterias
1944	Oswald Avery, Colin Macleod, Maclyn McCarty	Explicación del trabajo de Griffith, el DNA es el material genético
1944	Selman Waksman and Albert Schatz	Descubrimiento de la estreptomicina
1946	Edward Tatum and Joshua Lederberg	Conjugación bacteriana
1951	Barbara McClintock	Descubrimiento de los transposones
1952	Joshua Lederberg and Norton Zinder	Transducción bacteriana
1953	James Watson, Francis Crick, Rosalind Franklin	Estructura del DNA
1959	Arthur Pardee, François Jacob, Jacques Monod	Regulación génica por una proteína represora
1959	Rodney Porter	Estructura de las inmunoglobulinas
1959	F. Macfarlane Burnet	Teoría de la selección clonal
1960	François Jacob, David Perrin, Carmon Sanchez, Jacques Monod	Concepto de operon
1960	Rosalyn Yalow and Solomon Bernson	Desarrollo del radioinmunoensayo (RIA)
1961	Sydney Brenner, François Jacob, and Matthew Meselson	RNA mensajero y ribosomas como lugar de síntesis de proteínas
1966	Marshall Nirenberg and H. Gobind Khorana	Descubrimiento del código genético
1967	Thomas Brock	Descubrimiento de bacterias capaces de crecer en fuentes termales con agua en ebullición
1969	Howard Temin, David Baltimore, Renato Dulbecco	Descubrimiento de retrovirus y transcriptasa inversa
1969	Thomas Brock and Hudson Freeze	Aislamiento de *Thermus aquaticus*, fuente de la DNA polimerasa *Taq*
1970	Hamilton Smith	Especificidad de acción de las enzimas de restricción
1973	Stanley Cohen, Annie Chang, Robert Helling, and Herbert Boyer	DNA recombinante
1975	Georges Kohler, Cesar Milstein	Anticuerpos monoclonales
1976	Susumu Tonegawa	Reordenacion en los genes de las inmunoglobulinas
1977	Carl Woese and George Fox	Descubrimiento de *Archaea*
1977	Fred Sanger, Steven Niklen, Alan Coulson	Métodos de secuenciación del DNA
1981	Stanley Prusiner	Caracterización de los priones
1982	Karl Stetter	Aislamiento del primer procariota con temperatura óptima superior a 100°C
1983	Luc Montagnier	Descubrimiento del VIH como causa del SIDA
1988	Kary Mullis	Descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
1995	Craig Venter and Hamilton Smith	Secuencia completa de un genoma bacteriano
1999	The Institute for Genomic Research (TIGR), y otros	Más de 100 genomas secuenciados total o parcialmente
2000	Edward Delong	Descubrimiento de *Archaea* marinas, proteorhodopsina y otros aspectos de la vida procariótica marina.

[a] Las principales fuentes de referencia incluyen Brock, T.D. (1961), *Milestones in Microbiology*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ; Brock, T.D. (1990). *The Emergence of Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Press, Cold spring Arbor, NY. El *año* se indica en cada caso como el año en el que se publicó el de *Eukarya*.

Además de los avances en las áreas *aplicadas* de la microbiología, lo que ha permitido tantos progresos en la sociedad humana, el siglo XX fue testigo de un amplio desarrollo de nuestros conocimientos sobre los principios *básicos* de la funcion microbiana. Por ejemplo, se descubrieron y clasificaron muchas clases de nuevos microorganismos dando así origen a una considerable extensión de la *sistemática bacteriana*. El estudio de los nutrientes que requieren los microorganismos y los productos que originan dieron lugar al área de la *fisiología microbiana*. Por otra parte, los avances registrados en el conocimiento de la estructura física y química de los microorganismos (*citología*), y en las enzimas microbianas y las reacciones que llevan a cabo (*bioquímica microbiana*) influyeron profundamente en la microbiología actual.

Desde mediados del siglo XX, un área de investigación básica que se desarrolló rápidamente fue la *genética bacteriana*, disciplina que se ocupa de la herencia y la variación bacteriana. Aunque a principios de siglo se tenían algunas ideas sobre la variación bacteriana hubo que esperar hasta el descubrimiento del intercambio genético en bacterias, alrededor de 1950, para que la genética bacteriana llegara a constituir realmente un intenso campo de estudio. La genética bacteriana, bioquímica, y la fisiología se desarrollaron fundamentalmente hacia mediados de siglo, permitiendo a principio de los años sesenta un conocimiento avanzado del DNA, RNA y la síntesis proteica. La aparición de la *biología molecular* se debe en gran medida a estos estudios con bacterias.

En el siglo XX también se desarrolló el estudio de los virus. Aunque Beijerinck descubrió el primer virus hace más de 100 años, la verdadera naturaleza de los virus no se conoció hasta mediados del siglo XX. Gran parte de este trabajo comprende el estudio de los virus que infectan bacterias, los llamados *bacteriófagos*. El descubrimiento de que la infección vírica era análoga a una transferencia génica constituyó un hallazgo importante y permitió establecer relaciones entre virus y otros elementos genéticos a partir de investigaciones realizadas con bacteriófagos.

Hacia 1970 nuestros conocimientos sobre los procesos básicos de la fisiología, la bioquímica y la genética bacteriana avanzaron de tal modo que hicieron posible manipular experimentalmente el material genético de las células usando las bacterias como instrumentos. También fue posible introducir material genético (DNA) de origen exógeno en bacterias y controlar su replicación y características. Esto llevó a la aparición de la *biotecnología*. Aunque la biotecnología tuvo sus orígenes en estudios básicos, su aplicación al bienestar humano ha requerido el uso de los principios de la fisiología y de la microbiología industrial, lo que es un buen ejemplo que ilustra cómo la investigación básica y la aplicada avanzan juntas. También por esta época se pusieron a punto técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos susceptibles de ser usadas para establecer relaciones filogenéticas (evolutivas) entre procariotas, introduciendo así conceptos revolucionarios en la clasificación de los seres vivos en general y permitiendo comprender, por vez primera, la historia evolutiva de los microorganismos. Ahora, en el nuevo milenio, se pueden secuenciar con rapidez los genomas completos y, sin duda, estamos en la era del análisis genómico. La inmensa cantidad de información genómica de la que disponemos en la actualidad, está permitiendo lograr avances sorprendentes en medicina, ecología microbiana, microbiología industrial y muchas otras áreas relacionadas. Es fácil darse cuenta de que la ciencia de la microbiología ha recorrido un largo camino en 300 años. Pero lo mejor está por venir.

✓ 1.6 Revisión de conceptos

A diferencia de Koch y Pasteur, Beijerinck y Winogradsky estudiaron las bacterias del suelo y del agua y desarrollaron la técnica de cultivo de enriquecimiento para el aislamiento específico de varios grupos fisiológicos. En la segunda mitad del siglo XX los estudios conjuntos de la microbiología básica y aplicada supusieron las bases para el desarrollo de la actual microbiología molecular.

- ✓ ¿En qué consiste la técnica del cultivo de enriquecimiento y cuál fue su aportación como nuevo método en microbiología?
- ✓ Enumere las disciplinas de la microbiología que estudian: el metabolismo; la enzimología; la síntesis de ácidos nucléicos y proteínas; los microorganismos y su ambiente natural.

Preguntas de repaso

1. Indique seis propiedades importantes asociadas al estado vivo. ¿Cuál de estas propiedades se presenta en todas las células? ¿Cuál de estas propiedades se presenta solamente en algunos tipos de células?
2. Las células se pueden considerar como máquinas químicas y como sistemas de codificación. Explique las diferencias entre estos dos atributos de una célula.
3. ¿Qué se requiere para que ocurra la traducción en una célula? ¿Cuál es el producto del proceso de traducción?
4. ¿Qué es un ecosistema? ¿Viven los microorganismos en cultivo puro en un ecosistema? ¿Qué efectos pueden tener los microorganismos sobre sus ecosistemas?

5. ¿Cómo convencería a un amigo de que los microorganismos son mucho más que meros agentes causantes de enfermedades?
6. ¿Qué es un cultivo puro y cómo puede obtenerse? ¿Por qué el conocimiento de la obtención de cultivos puros fue tan importante para el desarrollo de la microbiología?
7. Explique el fundamento del matraz que utilizó Pasteur en los estudios sobre generación espontánea.
8. Comente la importancia de los medios sólidos de cultivo en el desarrollo de la microbiología como ciencia.
9. ¿Cómo contribuyó Ferdinand Cohn a la bacteriología?
10. ¿Cuáles son los postulados de Koch y cuál fue su influencia en el desarrollo de la microbiología?
11. Describa una contribución importante a la microbiología del científico pionero Martinus Beijerinck.
12. Usando la Tabla 1.1 como guía, compare el enfoque de la investigación microbiológica antes y después de la Segunda Guerra Mundial.

Ejercicios prácticos

1. Observe los organismos que se muestran en la Figura 1.1. Describa cómo las células que se muestran en los paneles (a) y (b) difieren de los organismos de los paneles (c) y (d). Indique tantas diferencias como pueda.
2. Los experimentos de Pasteur sobre la generación espontánea tuvieron una enorme importancia en el avance de la microbiología, a través de su impacto en la metodología, las ideas sobre el origen de la vida y la conservación de los alimentos, entre otros muchos aspectos. Comente brevemente la influencia de sus experimentos en cada uno de los temas señalados.
3. Describa las diferentes pruebas que Robert Koch usó para asociar de modo definitivo la bacteria Mycobacterium tuberculosis con la enfermedad de la tuberculosis. Sin la disponibilidad de alguno de los procedimientos que él desarrolló para el estudio de las enfermedades bacterianas, ¿habría sido posible establecer estas pruebas para la tuberculosis?

Las cianobacterias, como por ejemplo la bacteria filamentosa del género *Oscillatoria* que aquí se muestra, son bacterias cuyo metabolismo productor de oxígeno hizo posible que se dieran las condiciones necesarias para la aparición de formas superiores de vida en la Tierra. Es interesante mencionar que las cianobacterias constituyen una importante línea evolutiva que dio origen a los cloroplastos de los eucariotas fototróficos, desde las algas a los árboles. Los métodos moleculares han abierto la puerta al estudio de la diversidad microbiana, permitiendo a los microbiólogos construir un árbol universal de la vida y desvelar las multiples relaciones que existen entre los organismos más diversos.

2

PERSPECTIVA GENERAL DE LA VIDA MICROBIANA

I ESTRUCTURA CELULAR E HISTORIA EVOLUTIVA 22

2.1 Elementos de la estructura celular y vírica 22

2.2 Organización del DNA en las células microbianas 24

2.3 El árbol de la vida 26

II DIVERSIDAD MICROBIANA 27

2.4 Diversidad fisiológica de los microorganismos 28

2.5 Diversidad en los procariotas 29

2.6 Microorganismos eucarióticos 34

Glosario

Arqueas procariotas relacionados filogenéticamente, pertenecientes al dominio *Archaea* y distintos del dominio *Bacteria*

Bacterias procariotas relacionados filogéneticamente, pertenecientes al dominio *Bacteria* y distintos del dominio *Archaea*

Cromosoma elemento genético que lleva genes esenciales para el funcionamiento de la célula

Citoplasma contenido celular que se encuentra dentro de la membrana citoplasmática, excepto el núcleo (si existe)

Dominio el nivel más elevado de la clasificación biológica

Endosimbiosis el proceso mediante el cual se originaron las mitocondrias y los cloroplastos a partir de descendientes del dominio *Bacteria*

Eucariota una célula con un núcleo delimitado por una membrana nuclear y que en general presenta otros orgánulos, pertenecientes al dominio *Eukarya*

Extremófilo un organismo cuyo crecimiento óptimo se alcanza en condiciones ambientales extremas

Fototrofo un organismo que utiliza la luz como fuente de energía

Filogenia relaciones evolutivas entre organismos

Genoma el conjunto de genes de un organismo

Morfología forma celular

Nucleoide masa total de DNA que constituye el cromosoma de las células procarióticas (*Bacteria* y *Archaea*)

Núcleo una estructura rodeada por una membrana que contiene los cromosomas en células eucarióticas

Plásmido un elemento genético extracromosómico que no es necesario para el crecimiento

Procariota una célula que carece de un núcleo delimitado por una membrana nuclear y de otros orgánulos

Quimiolitotrofo organismo que obtiene su energía de la oxidación de compuestos inorgánicos

Quimioorganotrofo un organismo que obtiene su energía de la oxidación de compuestos orgánicos

Ribosoma una partícula citoplásmica donde se realiza el proceso de la síntesis de proteínas

I ESTRUCTURA CELULAR E HISTORIA EVOLUTIVA

En este capítulo se introducen los conceptos sobre la relación entre estructura y función celular y sobre la diversidad microbiana que reaparecerán a lo largo del libro. Se comparará aquí la arquitectura general de las células microbianas, se diferenciarán las células de los virus, se explorarán las características evolutivas esenciales del árbol de la vida y se considerarán finalmente algunos de los grupos más importantes de microorganismos que influyen sobre nuestras vidas y sobre nuestro planeta.

2.1 Elementos de la estructura celular y vírica

¿Cuál es la estructura de una célula? Todas las células tienen una barrera llamada *membrana citoplasmática o celular* que separa el interior de la célula del exterior. A través de ella entran los nutrientes y sustancias que la célula necesita y salen los materiales de desecho y otros productos. En el interior, y limitado por la membrana citoplasmática, se encuentra una compleja mezcla de sustancias y estructuras que se denomina **citoplasma.** Estos materiales y estructuras, bien disueltos en agua o en suspensión, llevan a cabo las funciones de la célula.

Los principales componentes del citoplasma son, además del agua, las *macromoléculas* (en particular las *proteínas* y los *ácidos nucleicos*), los ribosomas, pequeñas moléculas orgánicas (muchas de ellas precursoras de macromolécu-

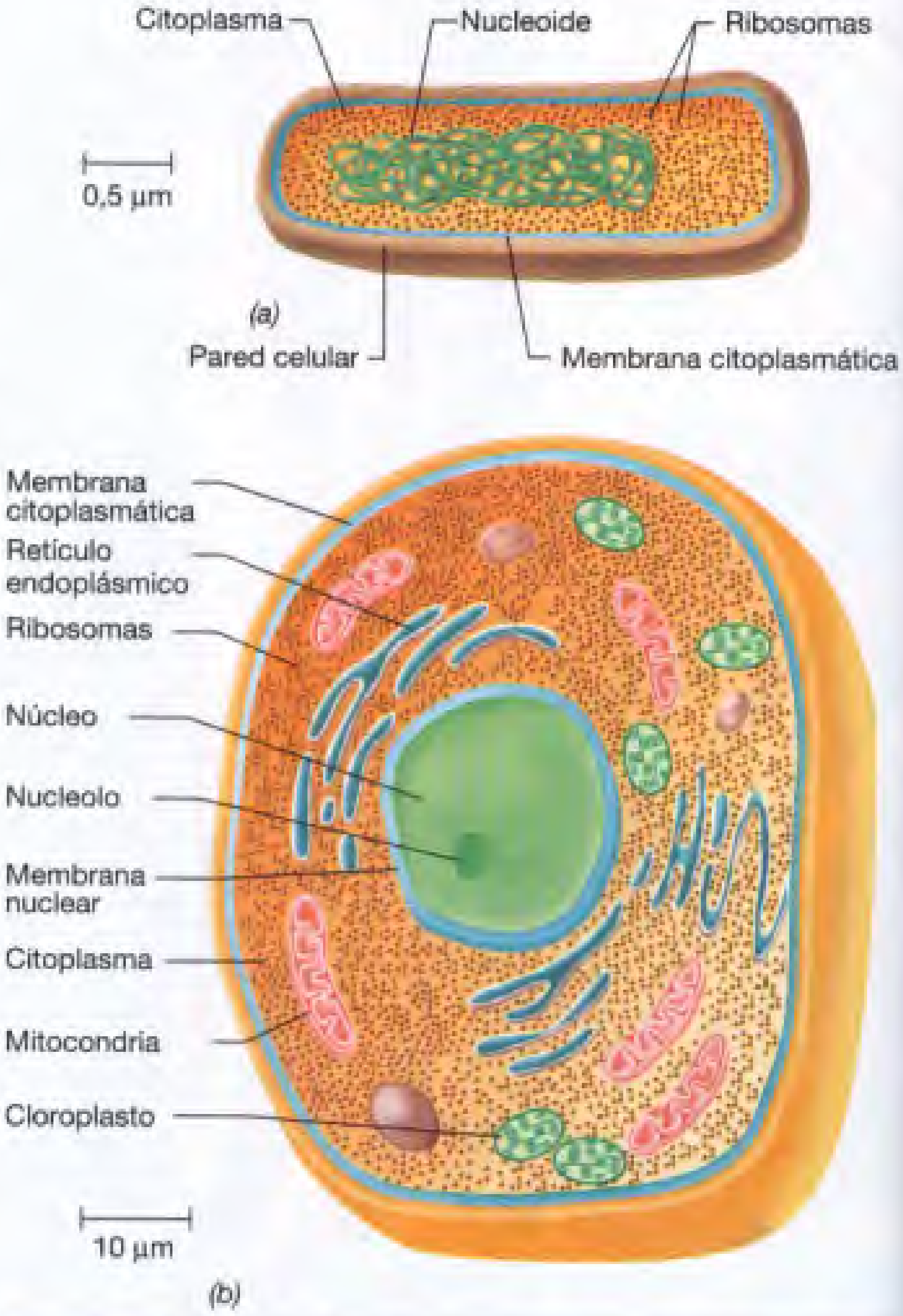


Figura 2.1 Estructura interna de las células microbianas. (a) Diagrama de un procariota. (b) Diagrama de un eucariota.

las) y varios iones inorgánicos. Los **ribosomas** constituyen las factorías celulares donde se sintetizan las proteínas y son estructuras particuladas compuestas de ácido ribonucleico (RNA) y diversas proteínas que interaccionan con otras proteínas solubles y con el RNA mensajero en el importante proceso de la *síntesis de proteínas*.

La **pared celular** proporciona rigidez estructural a las células. Es relativamente permeable, se encuentra en el exterior rodeando a la membrana citoplasmática (Figura 2.1*a*) y es una capa mucho más rígida que dicha membrana. Las células vegetales y la mayoría de los microorganismos poseen pared celular, mientras que la mayor parte de las células animales carecen de ella. (En su lugar, las células animales están reforzadas por una especie de andamiaje en el citoplasma que constituye el *citoesqueleto*.)

Células eucarióticas y procarióticas

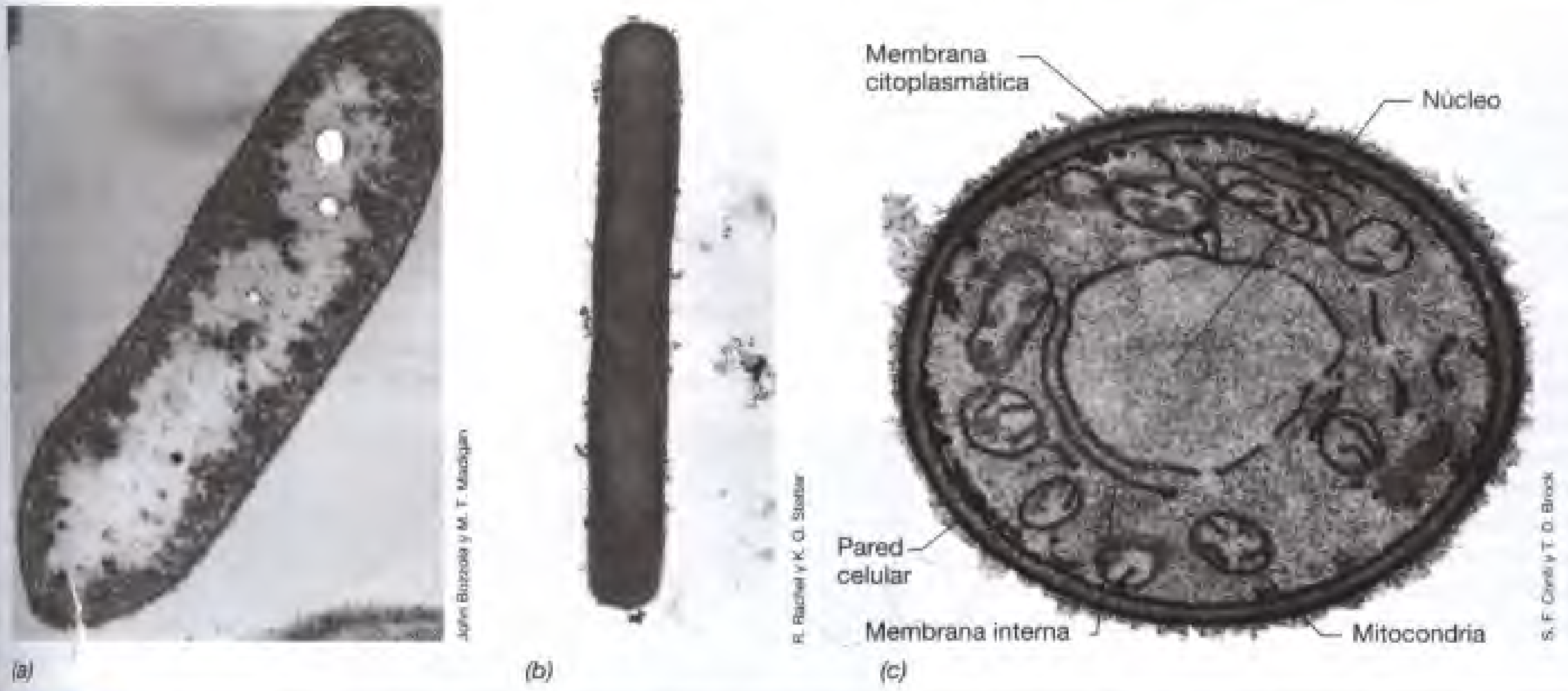
Un análisis detallado de la estructura celular interna permite diferenciar dos tipos de células: la *procariótica* y la *eucariótica* (Figura 2.1). Las células eucarióticas son por lo general más grandes y estructuralmente más complejas que las procarióticas, y una característica diferencial de las células eucarióticas, ausente en las procarióticas, es la presencia de estructuras limitadas por membranas llamadas *orgánulos*. Los orgánulos comprenden el *núcleo*, las *mitocondrias* y los *cloroplastos* (estos últimos sólo están presentes en las células fotosintéticas) (Figura 2.1*b*). Las mitocondrias y los cloroplastos desempeñan funciones específicas en la generación de energía, llevando a cabo la respiración y la fotosíntesis, respectivamente. Los microorganismos eucarióticos son las **algas**, los **hongos** y los **protozoos** (*véanse* Figuras 2.23 y 2.24). Todos los metazoos (animales y plantas) están formados por células eucarióticas. Las células eucarióticas se tratarán con más detalle en el Capítulo 14.

A diferencia de las células eucarióticas, las células procarióticas tienen una estructura interna más simple y carecen de orgánulos rodeados por membranas (Figura 2.1*a* y 2.2). Los **procariotas** comprenden las **Bacteria** y las **Archaea** (Figura 2.2*a,b*). Aunque las distintas especies de *Bacteria* y *Archaea* comparten una estructura celular de tipo procariótico, se diferencian notablemente entre sí por su historia evolutiva. A lo largo de este libro, el término *bacteria*, escrito con «*b*» minúscula, es sinónimo de *procariota*; mientras que el término *Bacteria*, escrito con «*B*» mayúscula, se refiere a las especies de este gran grupo de procariotas evolutivamente relacionados, perteneciente al dominio *Bacteria*, distinto en este sentido particular de las *Archaea*.

Las células microbianas generalmente son muy pequeñas. Un bacilo procariótico típico mide de 1 a 5 micrometros (μm) de largo por 1 μm de ancho (un micrometro es la millonésima parte de un metro) y, por tanto, resulta invisible a simple vista. Para comprender esta magnitud hay que considerar que se podrían poner en fila 500 bacterias de 1 μm de largo sobre el punto final de esta frase. Las células eucarióticas por lo general son mucho mayores que las células procarióticas, pero el tamaño puede variar dentro de un amplio margen (Figura 2.3*c*). Trataremos de nuevo con más detalle el tema del tamaño celular en el Capítulo 4.

Virus

Los **virus**, que constituyen una clase importante de microorganismos, no son células (Figura 2.3). Carecen de muchos atributos de las células y se diferencian particularmente de éstas en que no son sistemas dinámicos abiertos que toman nutrientes y vierten sustancias al exterior. Por el contrario, una partícula vírica es una estructura estática, muy estable e incapaz de cambiar o sustituir sus constituyentes. Un virus sólo adquiere el atributo clave de los sistemas vivos, es



John Bozzola y M. T. Madigan

R. Rachel y K. O. Stetter

S. F. Conti y T. D. Brock

Figura 2.2 Micrografías electrónicas de secciones de células de cada uno de los tres dominios de organismos vivos. (a) *Heliobacterium modesticaldum* (dominio *Bacteria*); la célula mide 1 × 3 μm. (b) *Methanopyrus kandleri* (dominio *Archaea*); la célula mide 0,5 × 4 μm. [Reinhold Rachel y Karl O. Stetter, 1981. *Archives of Microbiology* 128:288–293. ©1981 por Springer-Verlag GmbH & Co. KG.] (c) *Saccharomyces cerevisiae* (dominio *Eukarya*); la célula mide 8 μm de diámetro.

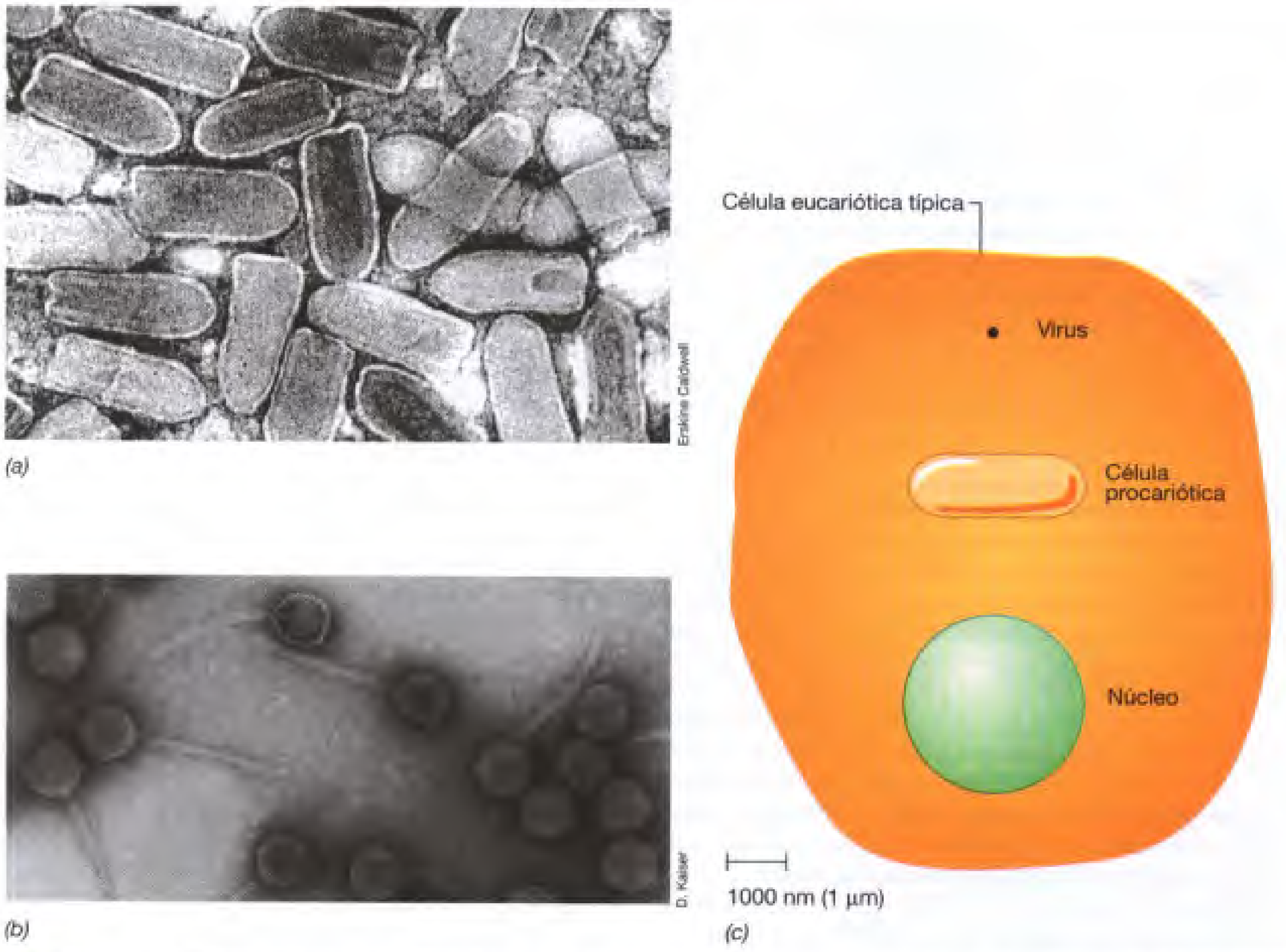


Figura 2.3 Estructura vírica y comparación del tamaño de virus y células. (a) Partículas de rhabdovirus (un virus que infecta a eucariotas). Cada partícula vírica individual mide cerca de 65 nm (0,065 μm) de diámetro. (b) El virus bacteriano lambda (bacteriófago). La cabeza de cada partícula mide cerca de 65 nm de diámetro. (c) Tamaño de los virus mostrados en (a) y (b) en comparación con una bacteria y una célula eucariótica.

decir, la reproducción, cuando infecta a una célula (*véase* Figura 1.3). A diferencia de las células, los virus no tienen capacidad metabólica propia. Además, aunque contienen sus propios genes, los virus carecen de ribosomas y, por tanto, dependen de la maquinaria biosintética celular para sintetizar proteínas.

Los virus infectan todo tipo de células, incluso las células microbianas. Muchos virus causan enfermedades en los organismos que infectan, pero la infección vírica no siempre conduce a enfermedad. En los Capítulos 9 y 16 expondremos que, además de originar enfermedades, los virus pueden tener otros efectos muy profundos sobre las células, llegando incluso a causar alteraciones genéticas que ocasionalmente pueden mejorar las capacidades de la célula. Los virus son mucho más pequeños que las células, mucho menores todavía que las células procarióticas. La Figura 2.3 ilustra los tamaños relativos de las células y los virus.

✓ 2.1 Revisión de conceptos

Todas las células microbianas poseen ciertas estructuras básicas comunes como membrana citoplasmática, ribosomas y, con frecuencia, pared celular. Se reconocen dos categoría celulares desde el punto de vista estructural: la procariótica y la eucariótica. Los virus no son células pero dependen de las células para llevar a cabo sus funciones replicativas.

- ✓ Observando el interior celular, ¿cómo podría decir si una célula es *procariótica* o *eucariótica*?
- ✓ ¿Cuál es la función importante de los *ribosomas* en las células?
- ✓ ¿Cuál es la longitud típica de una célula bacteriana con forma de bacilo? ¿Cuántas veces es usted mayor que una de estas células aisladas?

2.2 Organización del DNA en las células microbianas

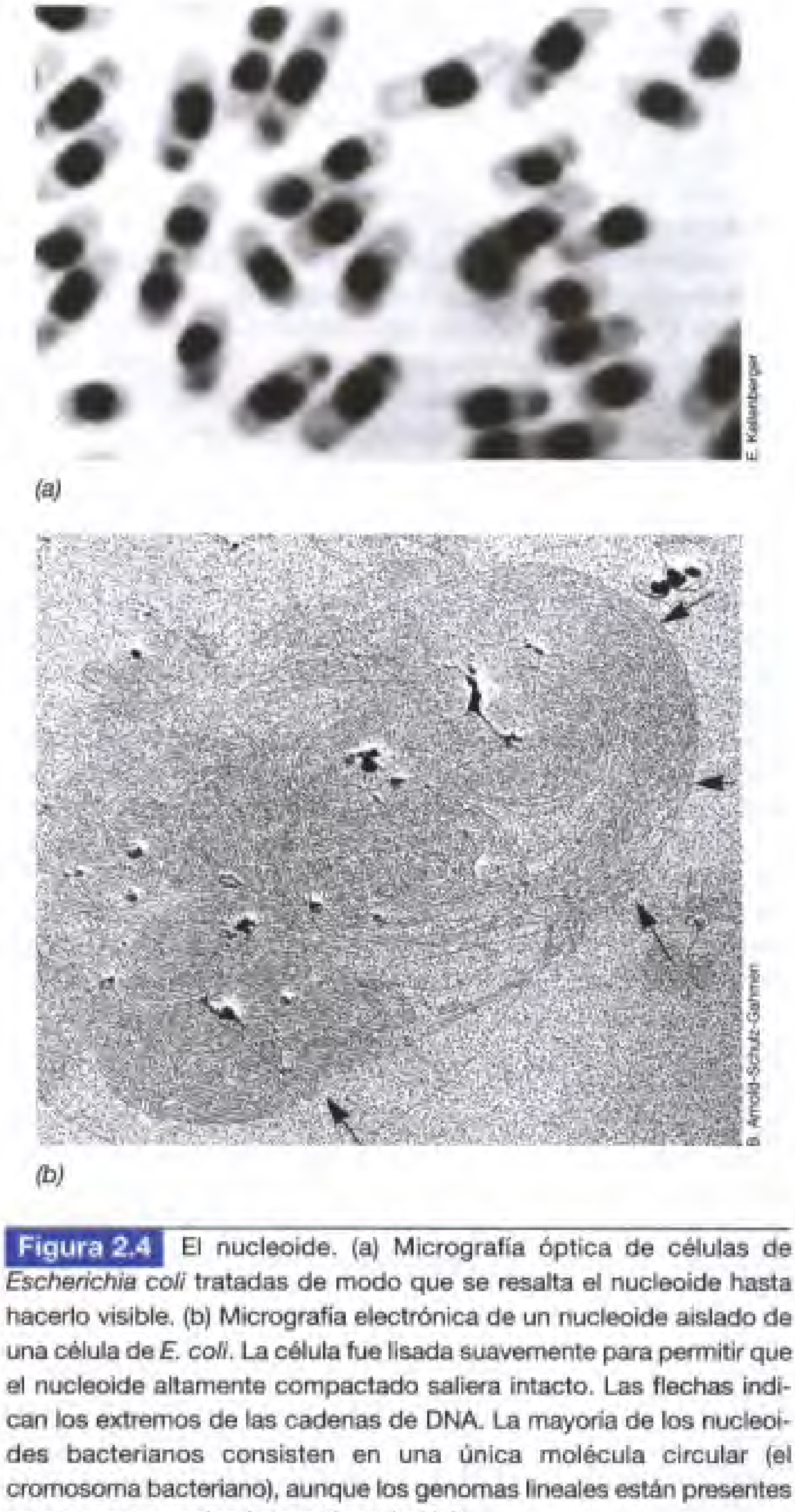
En todas las células los procesos vitales están controlados por su dotación genética, es decir, por su conjunto de genes (**genoma**). Un gen puede ser definido como un segmento de DNA que codifica una proteína (a través del RNA mensajero) u otra molécula de RNA, como el del RNA ribosómico. En el Capítulo 15, analizaremos los rápidos avances experimentados en la secuenciación y el análisis de genomas de los organismos vivos, desde las bacterias hasta el hombre, que han permitido disponer de informaciones genómicas detalladas en centenares de organismos diferentes. Ahora sólo consideraremos cómo se organizan los genomas en las células procarióticas y eucarióticas.

Núcleo *versus* Nucleoide

Los genomas presentan una organización diferente en células procarióticas y en células eucarióticas. En las procarióticas, el DNA se encuentra como una larga molécula de dos cadenas formando *el cromosoma bacteriano* que se condensa para dar origen a una masa visible llamada **nucleoide** (Figura 2.4). Como se indica en el Capítulo 7, en la mayoría de los organismos procarióticos el DNA es *circular* y, en general, poseen un cromosoma *único*. Por esta razón, la mayoría de los procariotas contienen una *sola copia* de cada gen y, por consiguiente, son genéticamente *haploides*. La mayoría de los procariotas contienen también pequeñas cantidades de DNA extracromosómico, dispuesto habitualmente de modo circular, que constituyen los **plásmidos**. Los plásmidos suelen contener genes que confieren propiedades especiales a las células (por ejemplo, propiedades metabólicas especiales), pero no llevan los genes esenciales que se requieren básicamente para la supervivencia y que se localizan en el cromosoma.

En los eucariotas, el DNA se presenta dentro del núcleo en moléculas lineales empaquetadas en un estado muy organizado formando los **cromosomas**. El número de cromosomas depende del organismo. Por ejemplo, la levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae*, contiene 16 cromosomas dispuestos en 8 pares, mientras que las células humanas contienen 46 (23 pares). Los cromosomas de los eucariotas contienen algo más que DNA; contienen también proteínas que favorecen el plegamiento y el empaquetamiento del DNA, así como otras proteínas necesarias para la expresión génica. Una diferencia fundamental entre procariotas y eucariotas es que estos últimos contienen típicamente *dos copias* de cada gen y son, por tanto, genéticamente *diploides*. Durante la división celular en células eucarióticas el núcleo se divide (tras duplicarse el número de cromosomas) mediante el conocido proceso de **mitosis** (Figura 2.5). De la división mitótica se originan dos células hijas idénticas y cada una de ellas recibe un núcleo con un conjunto completo de genes.

La dotación diploide del material genético de las células eucarióticas se reduce a la mitad mediante el proceso


E. Kellenberger

(a)

B. Arnold-Schulz-Gahmen

(b)

Figura 2.4 El nucleoide. (a) Micrografía óptica de células de *Escherichia coli* tratadas de modo que se resalta el nucleoide hasta hacerlo visible. (b) Micrografía electrónica de un nucleoide aislado de una célula de *E. coli*. La célula fue lisada suavemente para permitir que el nucleoide altamente compactado saliera intacto. Las flechas indican los extremos de las cadenas de DNA. La mayoría de los nucleoides bacterianos consisten en una única molécula circular (el cromosoma bacteriano), aunque los genomas lineales están presentes en algunas especies (*véase* Sección 7.4).

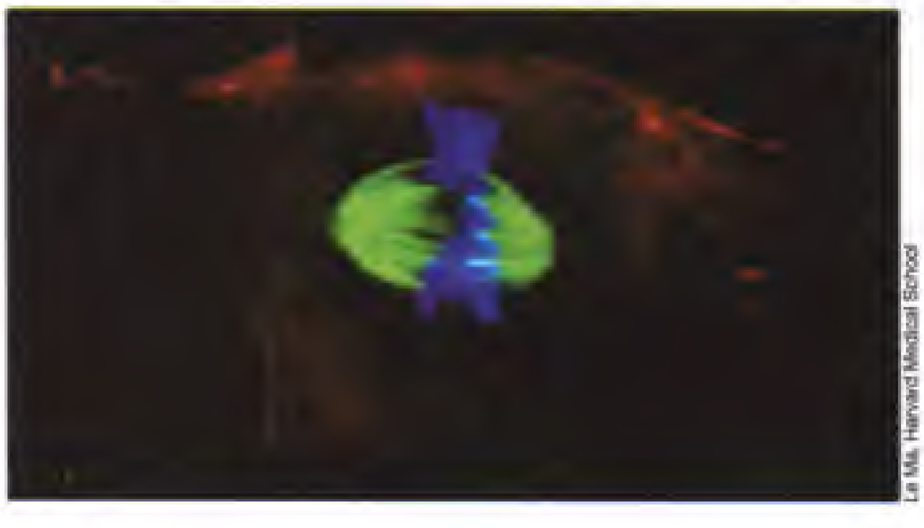

Le Ma, Harvard Medical School

Figura 2.5 Mitosis en células teñidas de rata canguro. La célula fue fotografiada en el estado de metafase de la división mitótica. El color verde corresponde a la tinción de una proteína llamada *tubulina* que es importante para la separación de los cromosomas (*véase* Sección 14.5). El color azul se debe a un colorante que tiñe DNA e indica los cromosomas. Aunque la mitosis es una parte integral del ciclo celular en las células eucarióticas, no ocurre en las células procarióticas.

de **meiosis** para formar gametos haploides en la reproducción sexual. La fusión de dos gametos durante la formación del zigoto restaura el estado diploide de la célula resultante. Estos procesos se presentan con más detalle en el Capítulo 14.

Genes

¿Cuántos genes y cuántas proteínas tiene una célula? Una bacteria típica, *Escherichia coli*, contiene un único cromosoma con DNA de alrededor de 4,6 millones de pares de bases. Como el cromosoma de *E. coli* ha sido completamente secuenciado, sabemos que contiene cerca de 4.300 genes. Algunas bacterias tienen un número de genes tres veces superior, pero otras no superan la ocatava parte de dicho número. Las células eucarióticas tienen muchos más genes que las procarióticas. Una célula humana, por ejemplo, contiene unas mil veces más DNA que *E. coli* y alrededor de 7 veces su número de genes (más adelante veremos que la mayor parte del DNA en las células eucarióticas es DNA no codificante). Una única célula de *E. coli* contiene aproximadamente 1.900 *tipos diferentes* de proteínas y cerca de 2,4 millones de moléculas de proteínas *en total*. Algunas proteínas son muy abundantes, otras lo son menos, y otras están presentes en una o en escasas copias. *E. coli*, por tanto, tiene mecanismos que *controlan la expresión* de sus genes de modo que no todos ellos se expresan con la misma frecuencia o al mismo tiempo. Esto se observa en todas las células, tanto procarióticas como eucarióticas; los mecanismos de expresión génica se desarrollan en el Capítulo 8.

✓ 2.2 Revisión de conceptos

Los genes dirigen las propiedades de las células y el conjunto de genes de una célula es lo que se conoce como su genoma. El DNA se dispone en las células formando cromosomas. Generalmente en los procariotas hay un solo cromosoma circular, mientras que en los eucariotas existen varios cromosomas lineales.

- ✓ Distinga entre núcleo y nucleoide.
- ✓ ¿En qué se diferencian los plásmidos de los cromosomas?
- ✓ ¿Qué sentido tiene que una célula humana tenga más genes que una bacteria?

2.3 El árbol de la vida

Cabe preguntarse si la estructura celular es reflejo de una relación evolutiva. La respuesta a esta pregunta es «sí» y «no». Los vínculos evolutivos entre las formas de vida son el objeto de estudio de la ciencia de la **filogenia**. Por una parte, se puede afirmar que todas las células procarióticas conocidas son distintas filogenéticamente de las eucarióticas. Por otra parte, parece claro que no todas las células procarióticas están relacionadas entre sí en un sentido evolutivo. Se llegó a esta conclusión tras estudios de la evolución molecular en procariotas, específicamente de las relaciones filogenéticas deducidas después de comparar las secuencias de macromoléculas esenciales. Por razones que se detallan en el Capítulo 11, unos cronómetros excelentes de la relación evolutiva son las macromoléculas ribosómicas, en especial los *RNAs ribosómicos*. Como todos los organismos contienen ribosomas, y por tanto RNA ribosómico, este tipo de moléculas se pueden usar y de hecho se han usado para construir un árbol filogenético para todas las formas de vida procariótica y eucariótica. Carl Woese, un microbiólogo estadounidense, fue el primero en advertir la posibilidad de emplear el RNA ribosómico como instrumento idóneo para establecer relaciones filogenéticas. La tecnología utilizada en estas estimaciones es ya una práctica rutinaria y se resume en la Figura 2.6.

Se han identificado tres líneas celulares filogenéticamente distintas a partir de la comparación de las secuencias del RNA ribosómico; dos de estas líneas contienen sólo procariotas, mientras la tercera está compuesta por eucariotas. Estas líneas evolutivas, conocidas como **dominios** evolutivos son *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya* (Figura 2.7). Se supone

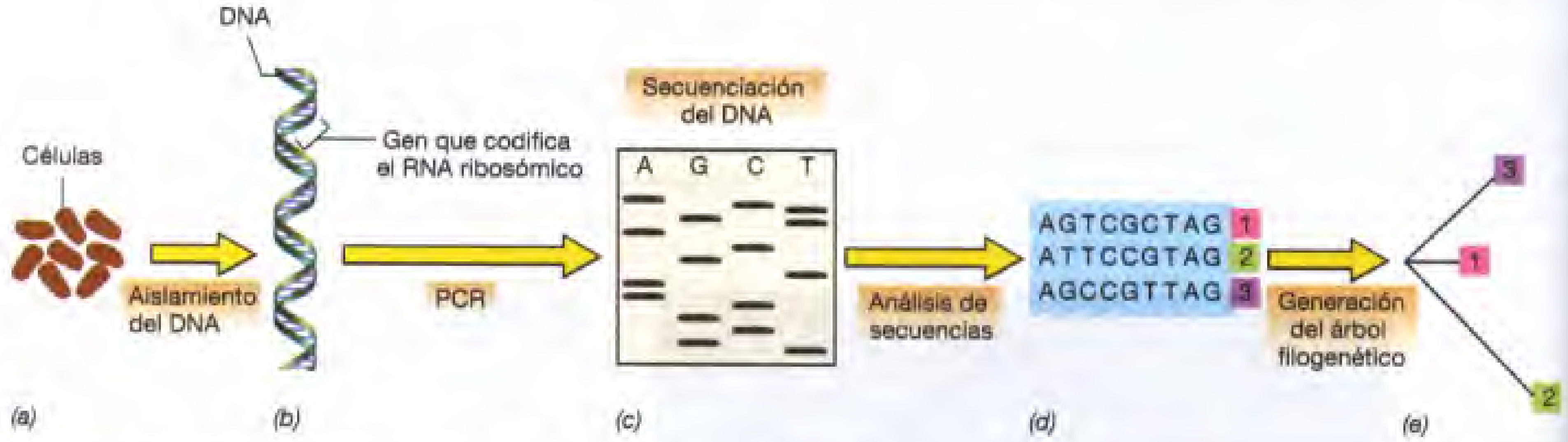


Figura 2.6 Secuenciación del gen del RNA ribosómico y filogenia. (a) Las células procedentes de un cultivo axénico, o de una muestra de un ambiente natural, se rompen; (b) se aisla el gen que codifica el RNA ribosómico y se producen luego muchas copias por la llamada técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, abreviadamente «PCR» (*véase* Sección 10.17); (c) el gen es secuenciado (*véase* Sección 10.13), y (d) las secuencias obtenidas se alinean por computadora. Un programa informático realiza comparaciones por pares y genera un árbol (e) que refleja las diferencias en la secuencia del RNA ribosómico del organismo analizado. Si en el análisis se usa una muestra natural, los genes del RNA ribosómico aislados de los diferentes microorganismos en la muestra deben ser clonados antes de ser amplificados y secuenciados. Para posteriores explicaciones de estos métodos, *véanse* Secciones 11.5 y 18.5.

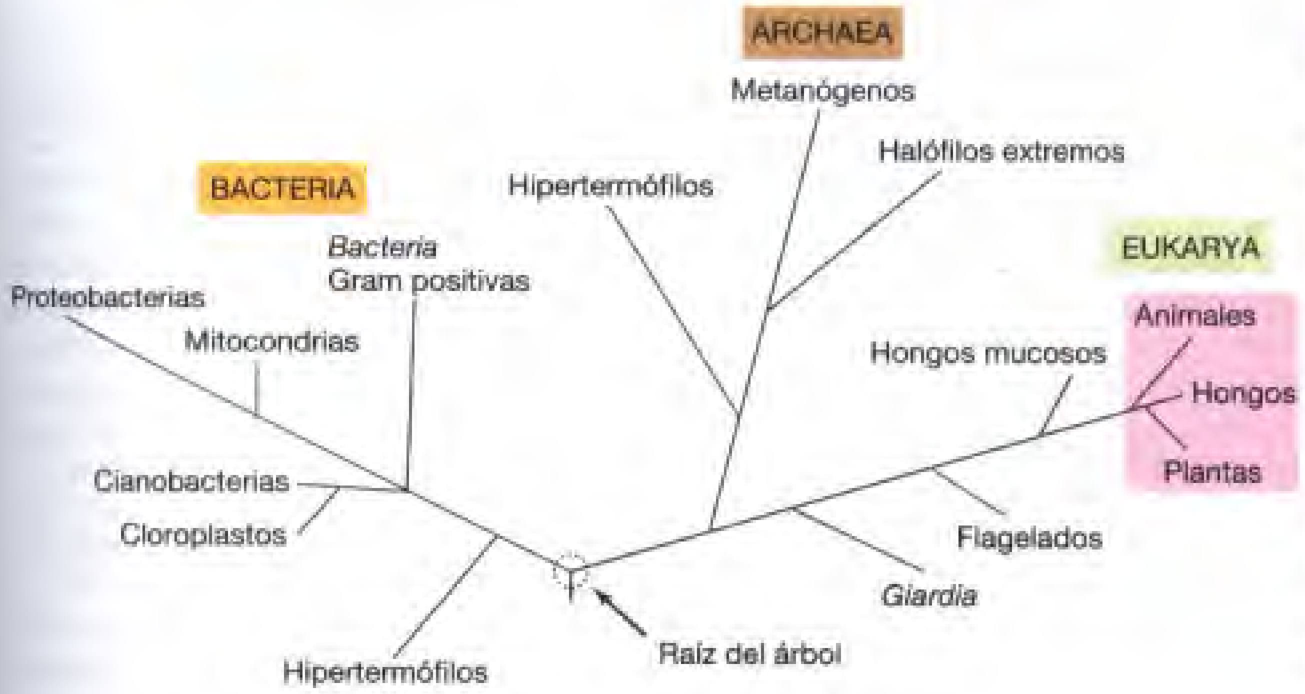


Figura 2.7 Árbol filogenético de la vida construido a partir de la comparación de las secuencias del RNA ribosómico. El árbol está formado por tres dominios de organismos: *Bacteria* y *Archaea*, que presentan células procarióticas, y Eukarya (células eucarióticas). Se indican solamente unos cuantos grupos de organismos dentro de cada dominio. Pueden verse árboles más detallados de cada dominio en las Figuras 2.9, 2.18 y 2.22; así como los árboles filogenéticos que se presentan en los Capítulos 11–14. Los hipertermófilos son procariotas que crecen mejor a temperaturas de 80°C o superiores. El grupo sombreado en rojo son *macro*organismos. El resto de los organismos en el árbol de la vida son *micro*organismos.

que en los comienzos de la historia de la vida sobre la Tierra, estos dominios surgieron por divergencia a partir de un organismo antecesor común, el «antecesor universal».

Además de mostrar claramente que no todos los procariotas están relacionados filogenéticamente, el árbol de la vida pone de manifiesto otro hecho evolutivo importante: las especies de *Archaea* están más relacionadas con los eucariotas que con las especies del dominio *Bacteria* (Figura 2.7). Este hecho, en apariencia sorprendente, ha recibido un considerable apoyo de los estudios comparativos realizados con otras macromoléculas de especies de cada uno de los tres dominios. Por tanto, la diversificación evolutiva a partir del antecesor común parece que fue en dos direcciones, hacia *Bacteria* por un lado y hacia «otra cosa» por otro lado, y que ésta última finalmente se diversificó dando origen a los dominios independientes de *Archaea* y *Eukarya*.

Como todas las células de los animales y las plantas son eucarióticas, se deduce que los microorganismos eucarióticos fueron precursores de los organismos pluricelulares. El árbol de la vida refleja claramente este hecho pues, como sería de esperar, los eucariotas microbianos constituyen una rama temprana del árbol mientras que los animales y las plantas se localizan hacia el extremo terminal (Figura 2.7). Además, se sabe ahora que las células eucarióticas contienen genomas de células pertenecientes a dos dominios de organismos. Además del genoma propio empaquetado en los cromosomas del núcleo celular, algunos orgánulos celulares de los eucariotas (específicamente las mitocondrias y los cloroplastos) contienen su propio DNA (normalmente en disposición circular, como en *Bacteria*) y sus propios ribosomas. Usando la tecnología descrita en la Figura 2.6 se ha demostrado que estos orgánulos son los antecesores derivados de líneas específicas del dominio de *Bacteria* (Figura 2.7). Probablemente, estos orgánulos fueron en otro tiempo células que vivían en estado libre y que, tal vez por protección o por razones de cooperación metabólica, establecieron una residencia estable dentro de células de *Eukarya* hace algunos eones (N. del R.: eón, unidad geocronológica de rango máximo, equivalente a mil millones de años, que comprende varias eras). El proceso por el que ocurrió esta adaptación se conoce como *endosimbiosis* (*véanse* Secciones 11.3 y 14.4).

La filogenia basada en el RNA ribosómico ha desvelado las relaciones evolutivas existentes entre todas las células. Más importante aun, esta tecnología ha creado un sistema evolutivo para los procariotas, lo que constituye un importante logro que la ciencia de la microbiología no había abordado desde sus principios. El árbol universal (Figura 2.7) puede hacerse más detallado añadiendo más secuencias adicionales del RNA ribosómico para establecer comparaciones (*véase* Figura 2.9). Además, como consideraremos más adelante, las técnicas desarrolladas para resolver el problema de la filogenia entre procariotas han tenido una aplicación muy importante en ecología microbiana y en microbiología clínica. Estos avances se considerarán en capítulos posteriores (*véanse* Capítulos 18 y 24).

✓ 2.3 Revisión de conceptos

La secuenciación del RNA ribosómico ha revolucionado la microbiología y suministrado un esquema evolutivo de los procariotas. Los tres dominios de la vida son *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*. La secuenciación del RNA ribosómico también ha puesto de manifiesto que los principales orgánulos de *Eukarya* tienen sus raíces evolutivas en *Bacteria* y ha proporcionado nuevos útiles para la ecología microbiana y el diagnóstico microbiológico.

- ✓ ¿Sobre qué prueba se apoya la idea de que *Bacteria* y *Archaea* son diferentes? ¿En qué son similares?
- ✓ ¿Qué prueba molecular respalda la teoría de la endosimbiosis?

II DIVERSIDAD MICROBIANA

La diversidad microbiana es el resultado de la evolución microbiana. Debido a que la evolución ha moldeado la vida en la Tierra, la diversidad tanto estructural como funcional que ahora se observa en las células microbianas es el efecto de miles de millones de años de experimentación evolutiva. La diversidad microbiana se expresa de muchos modos; por ejemplo, como variaciones en el tamaño celular y en la forma (morfología), en las estrategias metabólicas, en la movilidad, en los mecanismos de división celular, en el desarrollo, en la adaptación a condiciones ambientales extremas y en muchos otros aspectos de la biología celular. En las siguientes secciones dibujaremos a grandes trazos un cuadro de la diversidad microbiana. Se volverá a tratar el tema de la diversidad microbiana con más detalle en los Capítulos 12-14. Introduciremos la diversidad microbiana con una breve descripción de la diversidad metabólica, ya que ésta facilita, de acuerdo con las leyes físicas y químicas, el desarrollo y diversidad de los microorganismos. La diversidad metabólica se describe con más detalle en los Capítulos 5, 6 y 17.

2.4 Diversidad fisiológica de los microorganismos

Energía y carbono

Todas las células requieren energía. Como resume la Figura 2.8, la energía se puede obtener de tres modos: a partir de compuestos *orgánicos*, a partir de compuestos *inorgánicos* o a partir de la *luz*.

Muchos miles de sustancias químicas orgánicas diferentes que están presentes en la Tierra pueden ser usadas por un microorganismo o por otro para obtener energía.

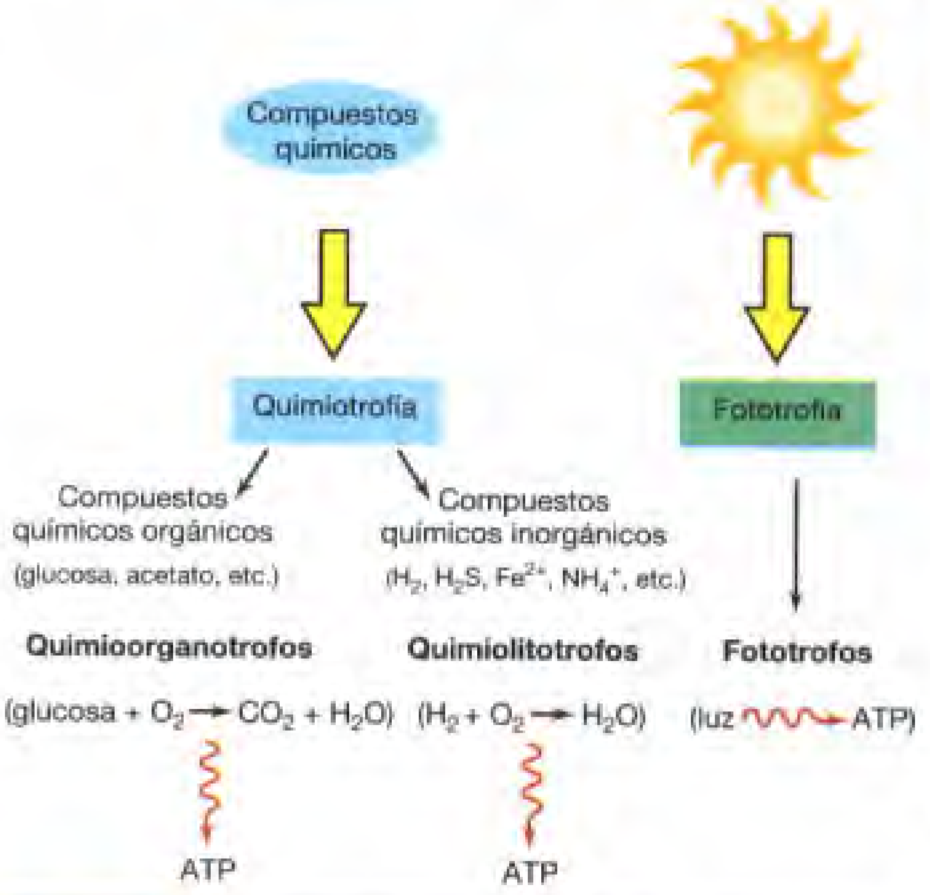


Figura 2.8 Opciones metabólicas para la obtención de energía. Los compuestos orgánicos e inorgánicos que se indican aquí son sólo unos cuantos de los muchos usados por los diversos organismos quimiotróficos. La oxidación de compuestos orgánicos o inorgánicos produce ATP en los organismos quimiotróficos, mientras la conversión de energía solar en energía química (también en forma de ATP) se produce en los organismos fototrópicos.

Todos los compuestos orgánicos naturales y gran parte de los sintéticos pueden ser desdoblados por uno o varios microorganismos. La energía se obtiene por *oxidación* (pérdida de electrones) del compuesto y se conserva en la célula como un compuesto de alta energía, el **trifosfato de adenosina** (**ATP**, Figura 2.8). Algunos microorganismos sólo pueden obtener energía del compuesto en presencia de oxígeno; son los llamados **aerobios**. Otros obtienen la energía solamente en ausencia de oxígeno (**anaerobios**). Finalmente, otros utilizan los compuestos orgánicos tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Los organismos que obtienen la energía a partir de compuestos *orgánicos* se llaman **quimioorganotrofos** (Figura 2.8). La mayor parte de los organismos que se han logrado cultivar son quimioorganotrofos.

Varios procariotas pueden captar la energía que está disponible en compuestos inorgánicos. Este tipo de metabolismo se llama *quimiolitotrofía* y es llevado a cabo por microorganismos **quimiolitotróficos** (Figura 2.8). Esta forma de metabolismo energético se encuentra sólo en procariotas y está ampliamente distribuida tanto entre especies de *Bacteria* como de *Archaea*. El rango de compuestos inorgánicos diferentes que pueden usarse es amplio pero, como regla general, un procariota determinado suele especializarse en la utilización de uno o de un grupo de compuestos inorgánicos relacionados. Parece obvio que la capacidad de obtener energía de compuestos inorgánicos presenta sus ventajas: no existe competencia con los quimioorganotrofos. Además, muchos de los compuestos inorgánicos que son oxidados, como por ejemplo H_2 o H_2S, son en realidad *productos de desecho* de los quimioorganotrofos. Por tanto, los quimiolitotrofos han desarrollado estrategias para explotar recursos que muchos otros organismos no pueden usar.

Los **microorganismos fototróficos** contienen pigmentos que les permiten usar la luz como fuente de energía y, por tanto, sus células suelen ser intensamente coloreadas (*véase* Figura 2.10*a*). A diferencia de los organismos quimiotróficos, los fototróficos no usan compuestos químicos como fuente de energía y el ATP se obtiene a expensas de la luz solar. Claramente esto supone una ventaja muy significativa, ya que no existen problemas de competición por la energía con los quimiotrofos y la luz está disponible en una amplia variedad de hábitat microbianos.

Todas las células requieren *carbono* como un nutriente principal. Las células microbianas son **heterotróficas** si requieren uno o más compuestos orgánicos como fuente de carbono, o **autotróficas** si la fuente de carbono es el CO_2. Los quimioorganotrofos también son heterotrofos. Por el contrario, muchos quimiolitotrofos y prácticamente todos los fototrofos son autotrofos. Los autotrofos se denominan también *productores primarios* porque sintetizan materia orgánica a partir de CO_2, tanto para su propio beneficio como para el de los quimioorganotrofos. Estos últimos se alimentan directamente de los productores primarios o viven a expensas de los productos que ellos excretan.

Tolerancia a condiciones ambientales extremas

Otro aspecto de la diversidad fisiológica de los microorganismos, particularmente de los procariotas, es la notabl capacidad de algunas especies para vivir en hábitat caracterizados por uno o más parámetros extremos en las condiciones ambientales. Por ejemplo, no sólo hay procariotas que crecen a pH 7 y a 25°C (condiciones que son ideales para los humanos) sino que los procariotas abundan en fuentes termales con agua en ebullición, en el hielo, en aguas de elevada salinidad, y en suelos y aguas que tienen un pH inferior a 0 o tan alto como 12. Por tanto, las especies de procariotas que habitan estos ambientes definen los límites biológicos de las condiciones fisicoquímicas extremas. En ocasiones, no se trata de que tales procariotas sean simplemente *tolerantes* a estas condiciones extremas, sino que realmente *requieren* tales condiciones para crecer. Por esta razón, estos procariotas se denominan *extremófilos* (proviene de *philos*, amante de), para resaltar su necesidad de una o más condiciones extremas. En el mundo de los eucariotas raramente se requieren condiciones extremas para crecer y, cuando ocurre, tales situaciones extremas son mucho más moderadas. En los hábitat que presentan condiciones ambientales extremas los procariotas son siempre mayoritarios. La Tabla 2.1 resume algunos de los «récords» que presentan procariotas extremófilos y los tipos de hábitat en que residen.

✓ 2.4 Revisión de Conceptos

Todas las células necesitan fuentes de energía y de carbono. Los términos quimioorganotrofo, quimiolitotrofo y fototrofo definen células que usan compuestos orgánicos, inorgánicos o la luz como fuente de energía, respectivamente. Los microorganismos autotróficos usan CO_2 como fuente de carbono. Muchos procariotas viven en condiciones ambientales que los humanos consideramos extremas.

- ✓ ¿Cómo podría distinguirse un microorganismo *fototrófico* de otro *quimiotrófico* por simple observación microscópica?
- ✓ ¿Qué son los *extremófilos*?

2.5 Diversidad en los procariotas

Como hemos indicado, los procariotas forman dos dominios evolutivos, *Archaea* y *Bacteria* (Figura 2.7). En esta sección, nos moveremos por el árbol filogenético y consideraremos brevemente algunos organismos importantes. La mayor parte de los procariotas que son familiares a los que empiezan a estudiar microbiología pertenecen al dominio *Bacteria*, y comenzaremos con ellas.

Bacteria

El dominio *Bacteria* contiene una enorme variedad de procariotas. Todos los procariotas conocidos causantes de enfermedades (patógenos) pertenecen a *Bacteria*, así como miles de especies no patógenas, y en este dominio se presenta una gran variedad de morfologías y fisiologías. La división (phylum) **Proteobacteria** es la división más amplia de *Bacteria* (Figura 2.9). Dentro de las Proteobacterias se encuentran muchas bacterias quimiorganotróficas, como *Escherichia coli*, el organismo modelo por excelencia en fisiología microbiana, bioquímica y biología molecular, así como varias especies de fototrofos y quimiolitotrofos. Muchos de estos últimos grupos usan en su metabolismo sulfuro de hidrógeno (H_2S, huele a huevos podridos), produciendo azufre elemental que se deposita dentro o fuera de la célula (Figura 2.10). El azufre es un producto de oxidación del H_2S y puede ser posteriormente oxidado a sulfato (SO_4^{2-}). El sulfuro y el azufre se oxidan permitiendo funciones metabólicas tan importantes como la fijación del CO_2 (autotrofía) o la generación de energía (Figura 2.8).

Otros procariotas comunes del suelo y del agua, o especies que viven en o sobre plantas o animales, bien de modo casual u originando enfermedades, también son miembros de las Protobacterias. Tal es el caso de las *Pseudomonas*, muchas de las cuales pueden degradar compuestos orgánicos complejos y algunas veces tóxicos, tanto com-

TABLA 2.1 Clases y ejemplos de extremófilos[a]

Extremo	Término descriptivo	Género/especie	Dominio	Hábitat	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura							
Elevada	Hipertermófilo	*Pyrolobus fumarii*	*Archaea*	Caliente, fuentes hidrotermales submarinas	90°C	**106°C**	113°C
Baja	Psicrófilo	*Polaromonas vacuolata*	*Bacteria*	Hielo marino	0°C	**4°C**	12°C
pH							
Bajo	Acidófilo	*Picrophilus oshimae*	*Archaea*	Fuentes termales ácidas	–0,06	**0,7**[b]	4
Alto	Alcalófilo	*Natronobacterium gregoryi*	*Archaea*	Lagos carbonatados	8,5	**10**[c]	12
Presión	Barófilo	MT41 (Mariana Trench-41)[d]	*Bacteria*	Sedimentos oceánicos profundos	500 atm	**700 atm**	> 1000 atm
Sal (NaCl)	Halófilo	*Halobacterium salinarum*	*Archaea*	Salinas	15%	**25%**	32% (saturación)

[a] El microorganismo citado en cada categoría es el que tiene el récord actual en cuanto a requerir una condición extrema particular para crecer.

[b] *P. oshimae* también es un termófilo, con crecimiento óptimo a 60°C.

[c] *N. gregoryi* es un halófilo extremo, con crecimiento óptimo del 20% NaCl.

[d] La cepa MT41 (Mariana Trench-41) aún no tiene un nombre oficial de género ni de especie y también es un psicrófilo, crece mejor por debajo de 10°C.

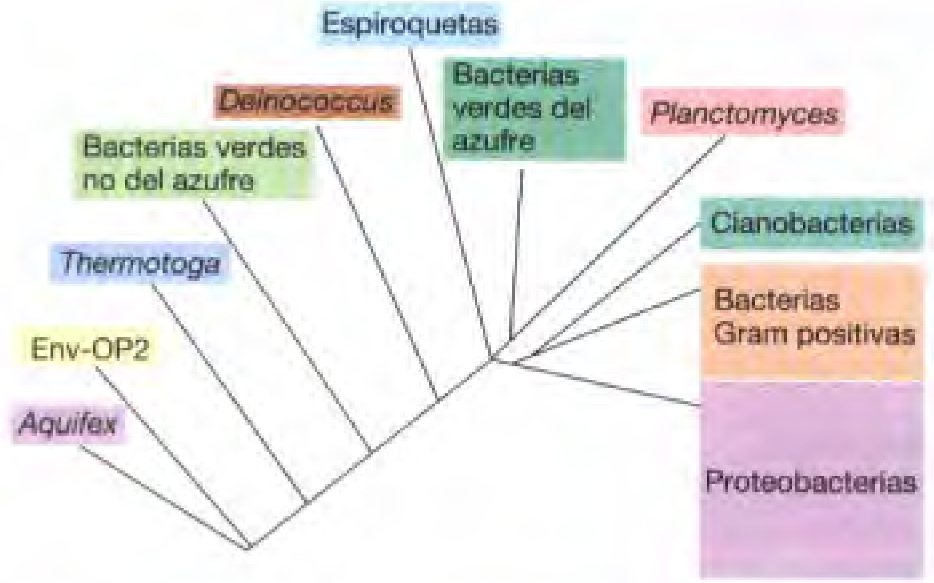
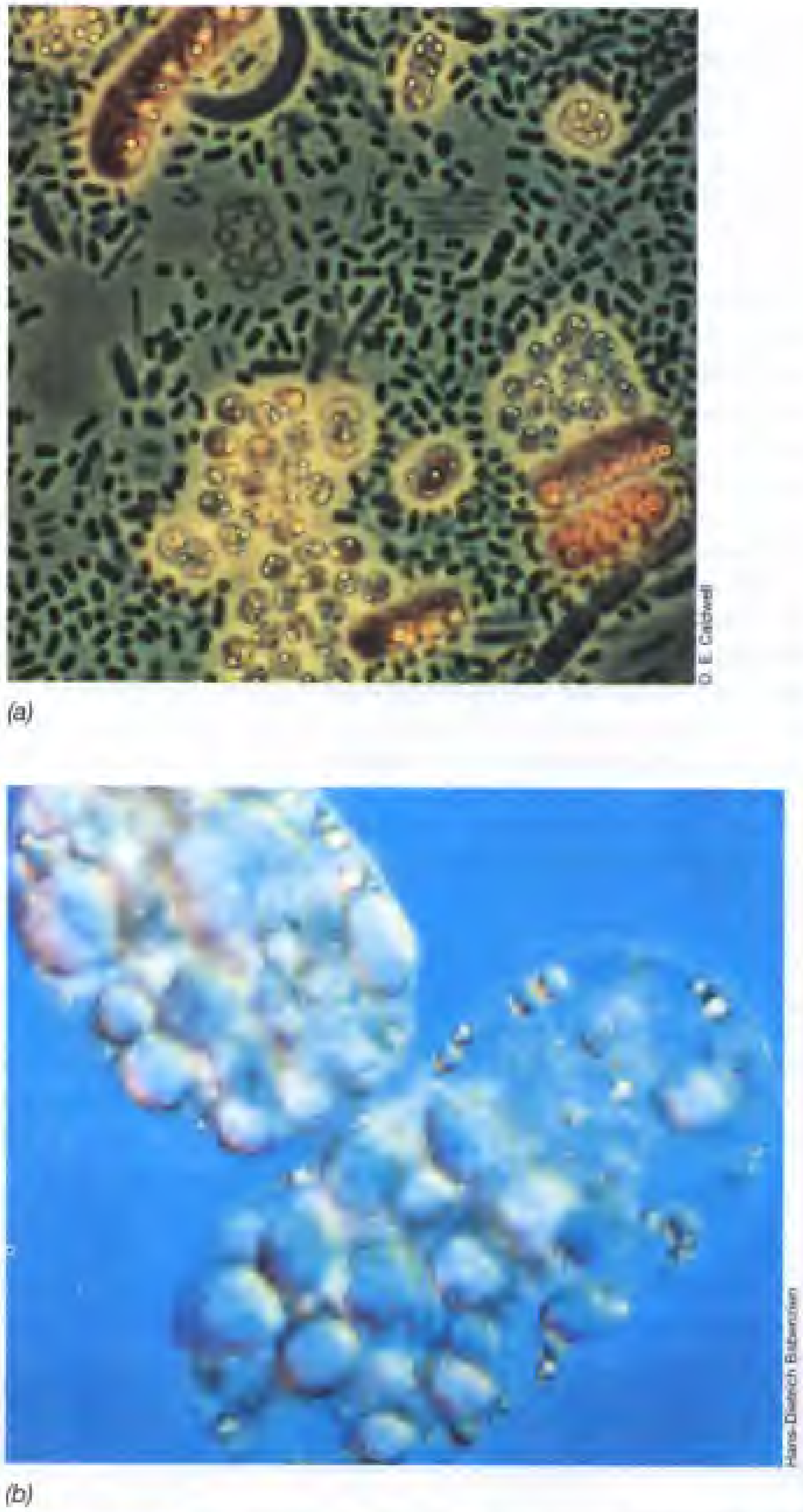


Figura 2.9 Árbol filogenético detallado del dominio *Bacteria*. No se indican en este árbol todos los grupos conocidos de *Bacteria*. Los tamaños relativos de los recuadros coloreados indican el número de géneros y especies contenidas en cada uno de los grupos. En la actualidad, las Proteobacterias son el grupo más amplio conocido. La rama marcada en el árbol como «Env» (del inglés *environmental*, ambiental) no representa un microorganismo cultivado sino una secuencia génica del RNA ribosómico aislado de un organismo presente en una muestra natural (*véase* texto). Aunque no se indican, hay muchos otros organismos «Env» conocidos que se distribuyen por prácticamente todo el árbol.

puestos orgánicos naturales como sintéticos, y *Azotobacter*, una bacteria fijadora de nitrógeno en estado libre.

Las propiedades de tinción de las bacterias se tratarán en el Capítulo 4. Ahora basta considerar que algunas bacterias se pueden distinguir mediante la tinción de Gram. La línea de *Bacteria* Gram positivas contiene especies unidas por una filogenia común y una estructura similar de la pared celular. Aquí encontramos a *Bacillus* formadores de endosporas (descubiertos por Ferdinand Cohn, *véase* Sección 1.5) (Figura 2.11*a*) y a *Clostridium*; y procariotas relacionados formadores de endosporas, tales como el productor de antibióticos *Streptomyces*. También están en este grupo las bacterias del ácido láctico, habitantes comunes de materias vegetales en descomposición y de productos lácteos, entre los que se incluyen organismos tales como *Streptococcus* (Figura 2.11*b*) y *Lactobacillus*. Otras bacterias Gram positivas relacionadas son los micoplasmas. Estos interesantes procariotas carecen de pared celular, poseen genomas muy pequeños y a menudo son patógenos; *Mycoplasma* es uno de los principales géneros dentro de este grupo con importancia médica (*véase* Sección 12.21).

Las **Cianobacterias** (Figura 2.12) están filogenéticamente relacionadas con las bacterias Gram positivas (Figura 2.9) y son microorganismos fototróficos oxigénicos, lo que significa que en su metabolismo producen oxígeno molecular (O_2), igual que ocurre en las plantas. Las cianobacterias han sido muy importantes en la evolución ya que fueron los primeros fototrofos oxigénicos que aparecieron sobre la Tierra (*véase* Figura 1.1) y su producción de O_2 permitió que se diesen las condiciones necesarias para la evolución de los procariotas que podían respirar O_2. El desarrollo de los «organismos superiores», como las plantas y los animales, por supuesto, siguió a todo esto.


D. E. Caldwell

(a)

Hans-Dietrich Babenzien

(b)

Figura 2.10 Proteobacterias fototrópicas y quimiolitotróficas. (a) La bacteria roja del azufre *Chromatium* es fototrofa (células bacilares largas y rojizas en esta micrografía de una comunidad microbiana natural). Cada célula tiene unos10 μm de diámetro. (b) La gran bacteria oxidante de azufre *Achromatium* es quimiolitotrofa. Cada célula tiene unos 20 μm de diámetro. En ambas células se aprecian glóbulos de azufre elemental. Ambos organismos logran por métodos distintos la oxidación del sulfuro de hidrógeno (H_2S) producido por las bacterias reductoras de sulfatos. Los últimos son quimioorganotrofos que oxidan compuestos orgánicos o H_2 y lo acoplan con la reducción del sulfato (SO_4^{2-}) a H_2S, completando así el ciclo del azufre (*véase* Sección 19.13).

Varias líneas evolutivas de *Bacteria* contienen especies con morfologías únicas. Un ejemplo es el grupo de **Planctomyces** acuático, caracterizado por células con un pedúnculo peculiar que permite al organismo fijarse a un sustrato sólido (Figura 2.13), y las **Espiroquetas** de morfología he-

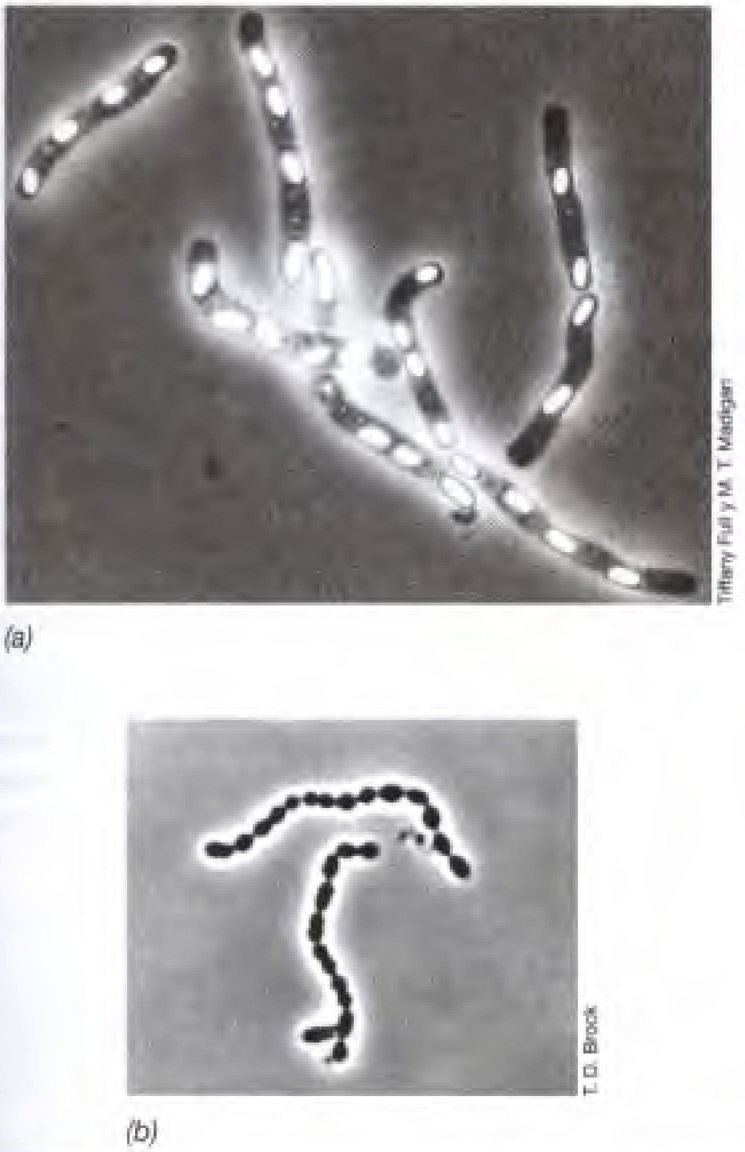


Figura 2.11 Bacterias Gram positivas. (a) La bacteria formadora de endosporas *Bacillus* tiene forma de bacilo y aquí se muestra formando cadenas. Las endosporas se observan como estructuras brillantes y refráctiles dentro de las células. Las endosporas son muy resistentes al calor, compuestos químicos y radiación. (b) *Streptococcus* es una célula esférica que se presenta en cadenas. Los estreptococos se presentan con frecuencia en productos lácteos y algunos son patógenos muy potentes.

licoidal (Figura 2.14). Algunas enefermedades, como la sífilis y la enfermedad de Lyme (*véanse* Secciones 26.12 y 27.4), están producidas por espiroquetas.

Dos líneas importantes dentro del dominio *Bacteria* son fototróficas: las **bacterias verdes del azufre** y las **bacterias verdes no del azufre** (grupo *Chloroflexus*) (Figura 2.15). Las especies de ambas líneas evolutivas contienen pigmentos fotosintéticos similares y pueden crecer como autotrofos. *Chloroflexus* es un procariota filamentoso que habita en fuentes termales y zonas marinas poco profundas, formando tapetes microbianos estratificados que contienen una comunidad de microorganismos. *Chloroflexus* también es notable porque se piensa que representa un eslabón importante en la evolución de la fotosíntesis (*véanse* Secciones 12.35 y 17.7).

Otras dos líneas importantes de *Bacteria* son los grupos de las **Clamidias** y de **Deinococcus** (Figura 2.9). La mayoría de las especies del género *Chlamydia* son patógenas y causan diversas enfermedades respiratorias y venéreas en el hombre (*véanse* Secciones 12.27 y 26.13). Las clamidias son *parásitos intracelulares estrictos*, lo que significa que viven en el interior de las células de los organismos superiores, en concreto del hombre. Otros procariotas patógenos (por ejemplo, las especies de *Rickettsia*, un miembro de las

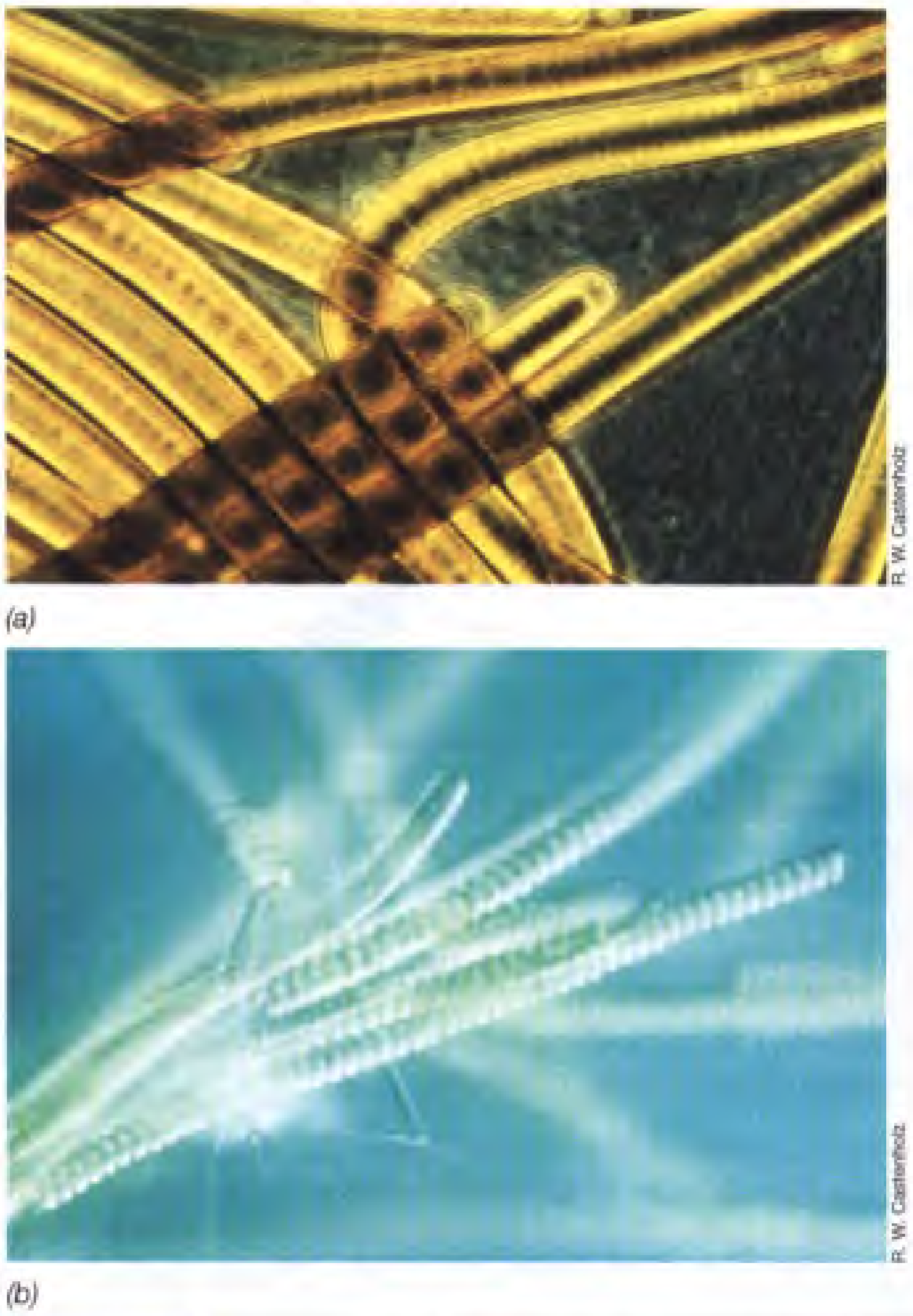


Figura 2.12 Cianobacterias filamentosas. (a) *Oscillatoria*. (b) *Spirulina*. Hace eones de años, las cianobacterias produjeron el oxígeno que ahora está presente en nuestro planeta. Se conocen otras muchas morfologías de cianobacterias, como unicelular, colonial y heterocística. La última contiene estructuras especiales llamadas *heterocistes* donde se realiza la fijación de nitrógeno (*véanse* Secciones 12.25 y 17.28).

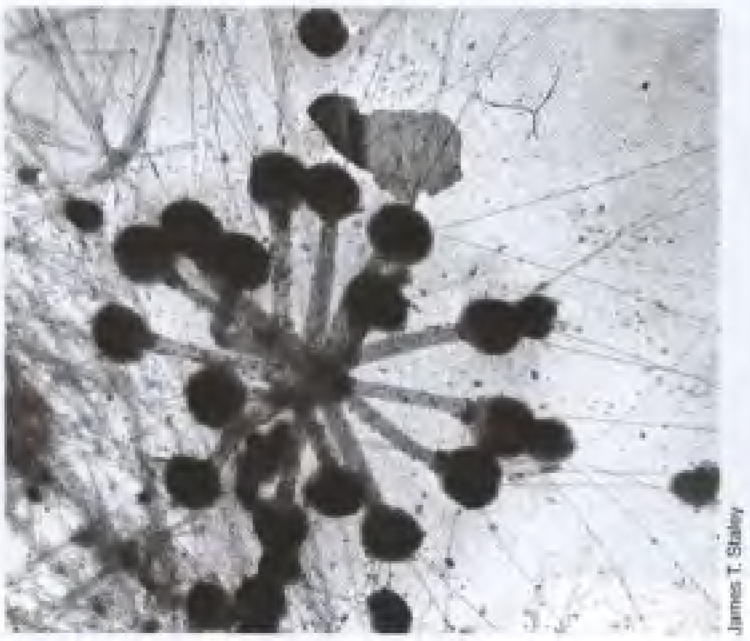


Figura 2.13 La bacteria pedunculada *Planctomyces* presenta una morfología poco común. Se muestran varias células unidas por su pedúnculo formando una roseta.

UNIVERSIDAD DE TALCA
BIBLIOTECA CENTRAL

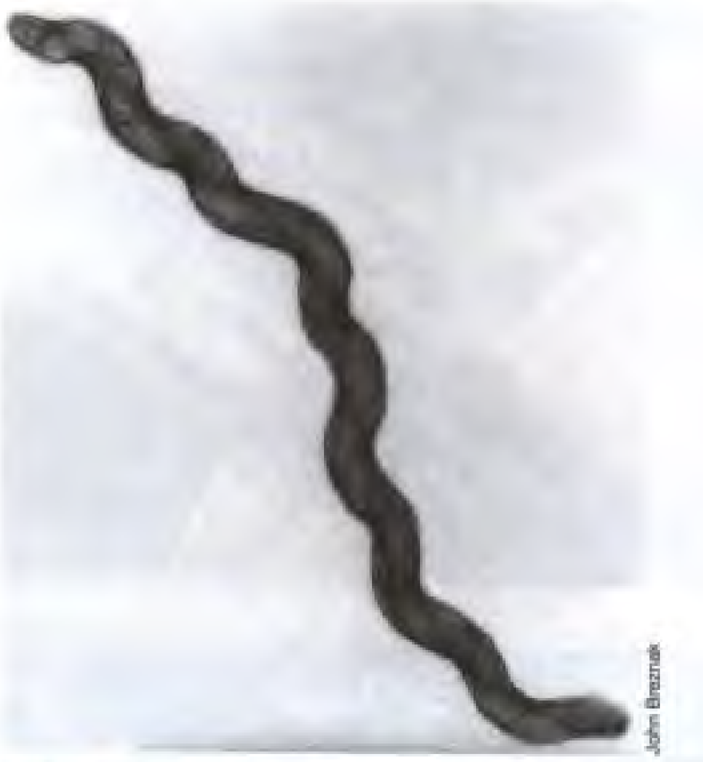


Figura 2.14 Espiroquetas. Se muestra una célula de *Spirochaeta zuelzerae*. Estos procariotas morfológicamente diferentes son también filogenéticamente distintos (*véase* Figura 2.9). Las espiroquetas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y algunas causan enfermedades como la sífilis o la enfermedad de Lyme. Reproducida con permiso de J. A. Breznak, 1973. *CRC Critical Reviews of Microbiology* 2:457-489. Original micrographs de R. Joseph y E. Canale-Parola, 1972. *Archives of Microbiology* 81:146-168.

Protobacterias cuyas especies pueden causar enfermedades como el tifus o la fiebre manchada de las Montañas Rocosas); o como *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria Gram positiva que produce la tuberculosis, también han desarrollado la estrategia de vivir y reproducirse *dentro* de las células eucarióticas. La localización intracelular de estos patógenos representa un medio por el que pueden evitar ser destruidas por la respuesta inmune del hospedador. La línea de *Deinococcus* contiene especies con paredes celulares poco comunes y una singular resistencia a niveles altos de radiación; *Deinococcus radiodurans* (Figura 2.16) es una especie importante de este grupo.

Por último, varias líneas del dominio *Bacteria* se separaron muy pronto en el árbol filogenético, muy cerca de la raíz (Figura 2.9). Aunque son grupos filogenéticamente diferentes unos de otros, comparten la propiedad común a todos ellos de crecer a elevadas temperaturas (*termofilia*). Organismos como *Aquifex* (Figura 2.17) o *Thermotoga* crecen en ambientes que están a una temperatura próxima a la de ebullición del agua; como es de suponer, sus hábitat son fuentes termales. La ramificación temprana de estas líneas en el árbol evolutivo (Figuras 2.7 y 2.9) tiene sentido si se tiene en cuenta que la Tierra primitiva estaba (*véase* Sección 11.1) a temperaturas muy elevadas y que por tanto la vida evolucionó en un principio en un planeta muy caliente. En este contexto, organismos como *Aquifex* y sus «parientes» próximos parecen ser los descendientes actuales de líneas celulares muy antiguas.

Archaea

Cuando se analiza el dominio *Archaea* (Figura 2.18) se observa que existen dos subdivisiones importantes de estos procariotas. Muchas *Archaea* son extremófilas, con especies capaces de crecer a las temperaturas más elevadas y a los valores más extremos de pH de todos los microorganismos conocidos (Tabla 2.1). Todas las *Archaea* son quimiotrofas, aunque *Halobacterium* (del que trataremos más adelante) puede usar la luz para sintetizar ATP, aunque no por la vía típica de los organismos fototróficos. Algunas *Archaea* usan compuestos orgánicos para obtener la energía, aunque la

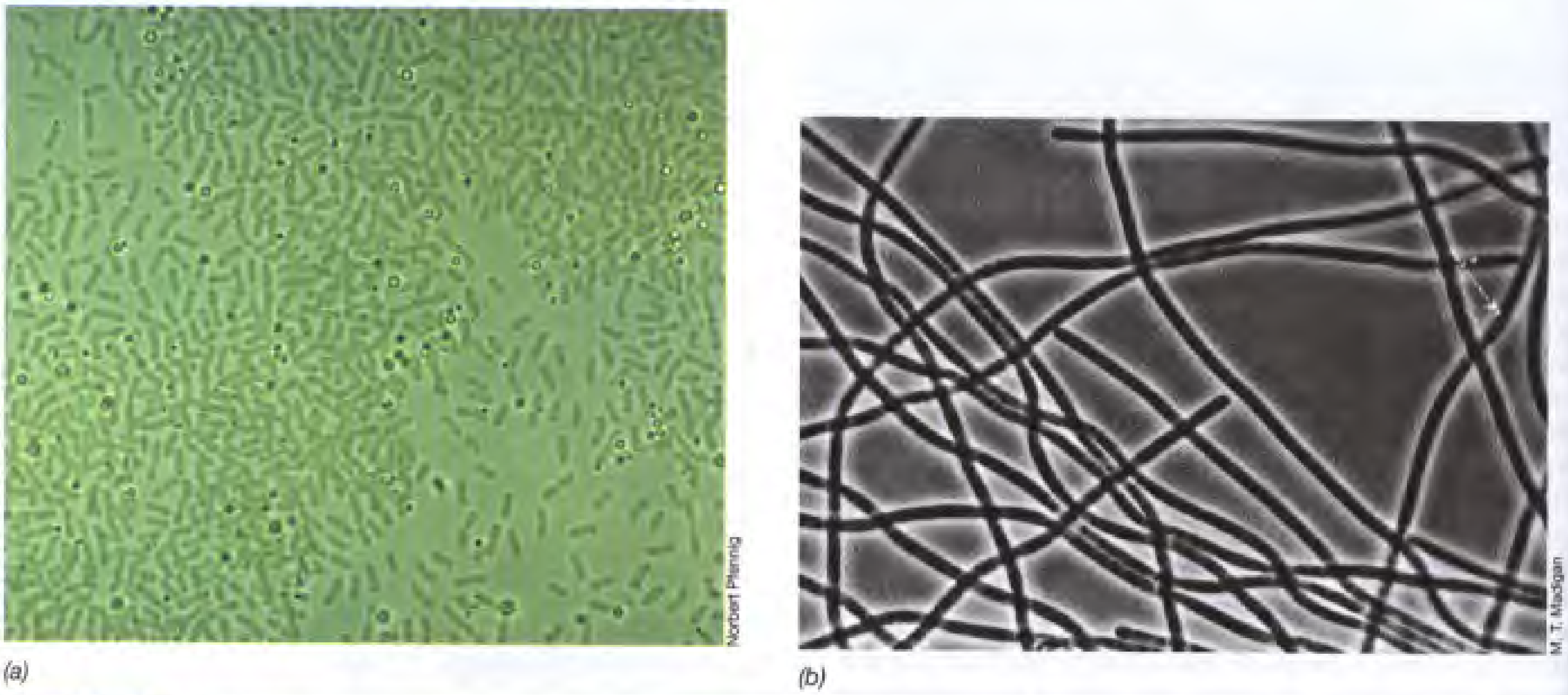


Figura 2.15 Bacterias verdes fototróficas. (a) *Chlorobium* (bacteria verde del azufre); (b) *Chloroflexus* (bacteria verde no del azufre). Aunque presentan algunas características comunes, como pigmentos y estructuras membranosas (*véase* Sección 17.2), estos microorganismos son filogenéticamente muy distintos (Figura 2.9).

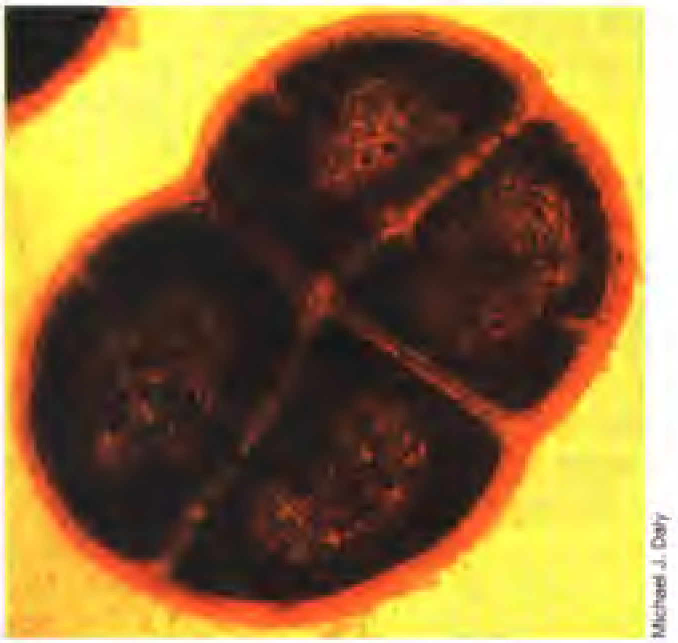

Michael J. Daly

Figura 2.16 La bacteria *Deinococcus radiodurans* es extraordinariamente resistente a las radiaciones. Este organismo puede soportar niveles de radiación muy superiores a los niveles suficientes para matar a un ser humano.

mayoría son quimiolitotróficas, siendo el hidrógeno gaseoso (H_2) su fuente de energía preferida (Figura 2.8). Muchas *Archaea* crecen a temperaturas elevadas. De modo similar a lo observado para el termófilo *Aquifex* (Figura 2.17), tales especies tienden a ramificarse cerca de la raíz del dominio (Figuras 2.9 y 2.17). La arquea *Pyrolobus* (Figuras 2.18 y 2.19), por ejemplo, es el microorganismo más termófilo de todos los procariotas conocidos (Tabla 2.1).

La otra rama principal del árbol de *Archaea* (Figura 2.18) contiene tres grupos de organismos con fisiologías muy diferentes. Algunas especies requieren O_2 mientras que otras lo evitan y algunas crecen en el rango de valores extremos de pH más inferior mientras otras lo hacen en el superior (Tabla 2.1). Los *metanógenos* como *Methanobacterium* son anaerobios estrictos. Su metabolismo es único en el ámbito de la biología por cuanto obtienen energía produciendo gas natural (¡metano!). Los metanógenos son procariotas con importancia ecológica en procesos de biodegradación de la materia orgánica que ocurren en la naturaleza (*véanse* Secciones 13.4, 17.17 y 19.10) y prácticamente todo el gas natural que se encuentra en la Tierra procede de su metabolismo.

Los halófilos extremos son parientes cercanos de los metanógenos (Figura 2.18), pero fisiológicamente son muy distintos de ellos. A diferencia de los metanógenos, que mueren en presencia de oxígeno, los halófilos extremos *necesitan* oxígeno y todos ellos requieren concentraciones de sal (NaCl) muy elevadas para llevar a cabo su metabolismo y reproducción. Precisamente por sus requerimientos de sal se les denomina *halófilos*. De hecho, los organismos del tipo de *Halobacterium* son tan «amantes de la sal» que pueden crecer so-

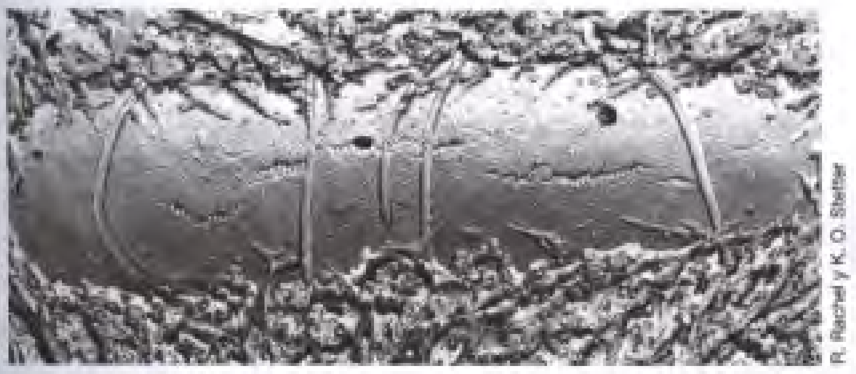

R. Rachel y K. O. Stetter

Figura 2.17 *Aquifex*. Esta especie primitiva del dominio *Bacteria* es un hipertermófilo cuya temperatura óptima de crecimiento es superior a 80°C.

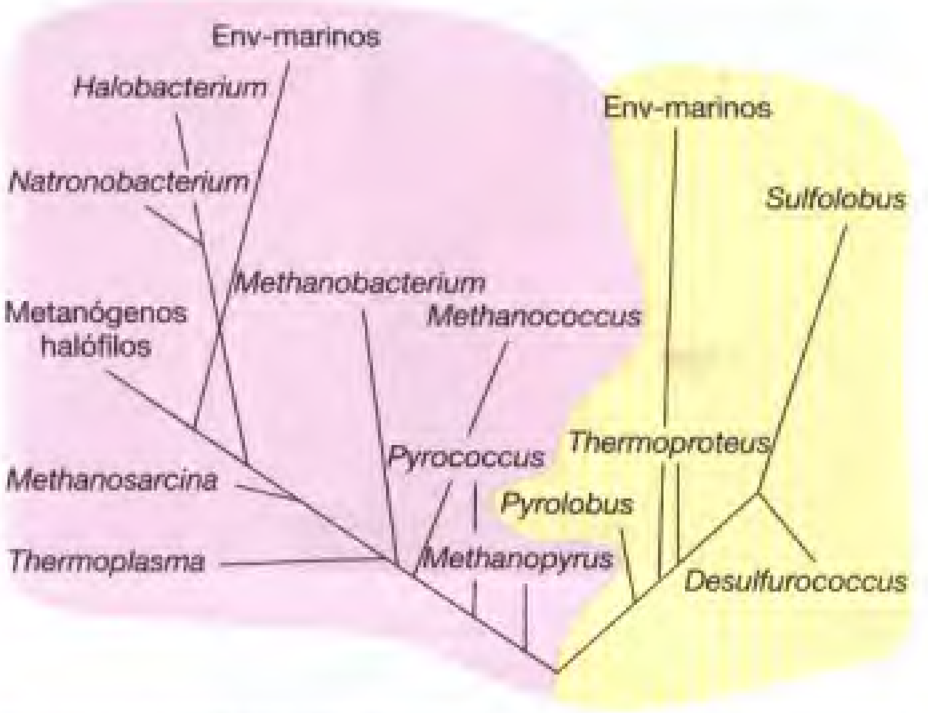


Figura 2.18 Árbol filogenético detallado del dominio *Archaea*. En el árbol no se señalan todos los grupos conocidos de *Archaea*. Se resaltan dos subgrupos importantes. Los organismos marcados en amarillo son fundamentalmente hipertermófilos, es decir, crecen a temperaturas muy altas. En rojo se indican los metanógenos, los halófilos y acidófilos extremos. Cada grupo mayoritario tiene sus propias ramas Env (*véase* la leyenda de la Figura 2.9 y el texto), la mayor parte de las cuales son microorganismos marinos. Aproximadamente se alcanza el mismo número de especies en ambos subgrupos de *Archaea*, pero el número total de *Archaea* cultivadas es mucho menor que el de *Bacteria*.

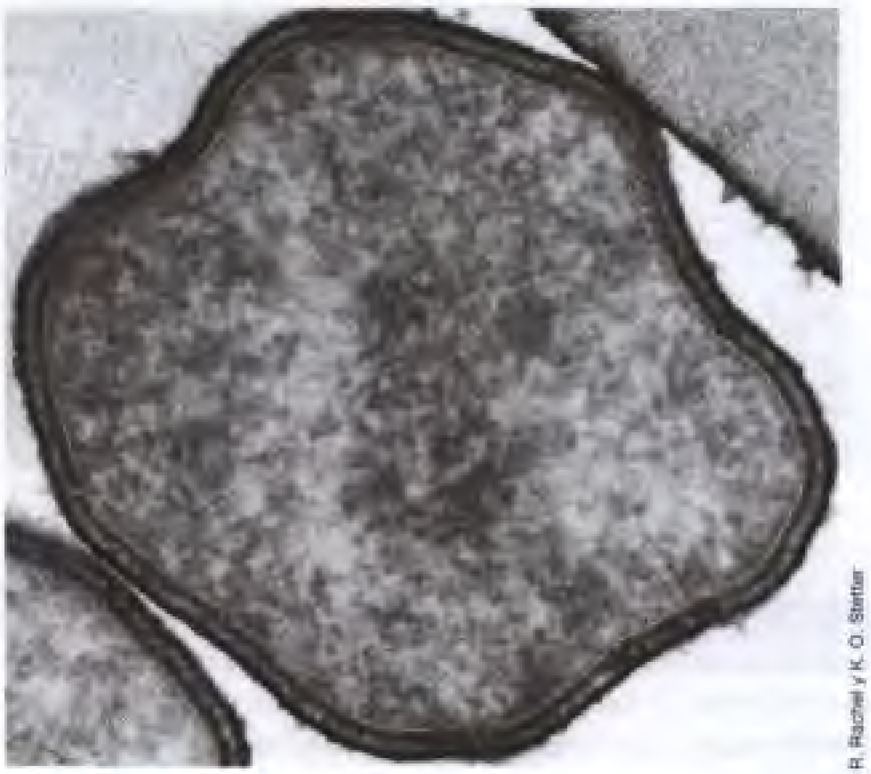
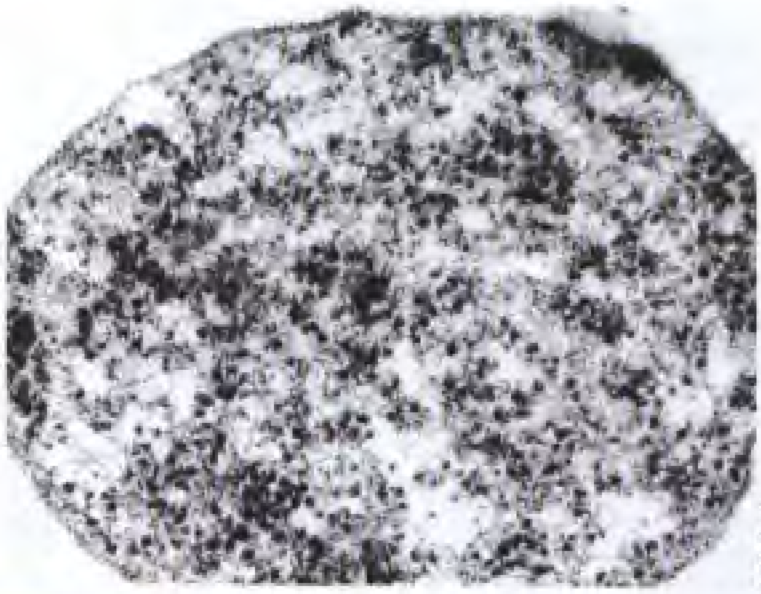

R. Rachel y K. O. Stetter

Figura 2.19 *Pyrolobus*. Se trata de una arquea hipertermófila capaz de crecer muy bien por encima del punto de ebullición del agua.

William D. Grant

Figura 2.20 *Archaea* es extremadamente halófila. Un vial con salmuera, a punto de precipitar el NaCl, conteniendo células del halófilo extremo *Halobacterium*. El organismo contiene pigmentos que absorben la luz e inducen la producción de ATP. Las células de *Halobacterium* también viven en el interior de los cristales de sal (véase recuadro, Capítulo 4, ¿Cuánto tiempo puede sobrevivir una endospora?

bre, o dentro de, cristales de sal (Figura 2.20). Como se ha indicado previamente (*véase* Sección 2.4) muchos procariotas pueden generar ATP a partir de la luz. Aunque no producen clorofila como los auténticos fototrofos, las especies de *Halobacterium* contienen pigmentos fotosensibles que pueden absorber la luz y sintetizar ATP (*véase* Sección 13.3). Las *Archaea* halófilas extremas habitan en lagos salinos, salinas costeras y otros ambientes muy salinos. Algunos halófilos extremos, como *Natronobacterium*, viven en ambientes acuosos caracterizados por elevadas concentraciones de sal y por elevados valores de pH. Tales organismos se denominan *alcalófilos* y de todos los organismos conocidos crecen a los valores de pH más elevados (Tabla 2.1).



T. D. Brock

Figura 2.21 La arquea *Thermoplasma* que se muestra aquí carece de pared celular y está estrechamente relacionada con *Picrophilus* (véase Tabla 2.1). Crece a temperaturas moderadamente altas y a valores de pH extremadamente bajos. El género *Mycoplasma* también contiene especies que carecen de pared celular, pero pertenece al dominio *Bacteria*. Los procariotas carentes de pared celular se tratan en las Secciones 12.21 y 13.5).

El último grupo de *Archaea* que consideraremos son los termoacidófilos, como *Thermoplasma* (Figura 2.21). Son procariotas que carecen de pared celular (similares en este aspecto a *Mycoplasma*) y que crecen mejor a temperaturas moderadamente altas y a valores extremadamente bajos de pH. En este grupo se incluye *Picrophilus*, que es el procariota más acidófilo de todos los conocidos.

Conviene no tener la idea incorrecta de que todas las *Archaea* son necesariamente extremófilas, pues las hay que no lo son y que pueden encontrarse en lagos, suelos y océanos. Desafortunadamente, hasta la fecha no ha sido posible cultivar en el laboratorio la mayoría de estas *Archaea*. Cabría preguntarse entonces cómo sabemos que existen. Se sabe porque podemos aislar con relativa facilidad los genes del RNA ribosómico a partir de células presentes en una muestra natural, por ejemplo de una muestra de suelo. Como si se tratara del aforismo «por el humo se sabe donde está el fuego», si una muestra particular de suelo o de agua contiene RNA ribosómico resulta obvio que debe estar presente el organismo al que pertenece dicho RNA ribosómico. De este modo, podemos procesar los genes del RNA ribosómico que encontramos en una muestra, secuenciarlos y luego situarlos en una rama del árbol filogenético que representa al microorganismo del que se aislaron dichos genes, incluso aunque ese microorganismo nunca haya sido cultivado. Estos métodos moleculares de ecología microbiana inicialmente ideados por Norman Pace, un microbiólogo estadounidense, permiten saber que la diversidad microbiana es mucho mayor de lo que inicialmente se había considerado y que muchos hábitat que no son extremos contienen numerosas *Archaea*. Compender la biología de tales *Archaea* y conseguir cultivarlas en medios de laboratorio es uno de los retos actuales de los microbiólogos.

✓ 2.5 Revisión de conceptos

Dentro de los dominios *Bacteria* y *Archaea* hay varias líneas evolutivas con enorme diversidad en lo que respecta a morfologías y fisiologías. El análisis de los genes del RNA ribosómico de las células que se encuentran en muestras de diversos orígenes naturales, ha puesto de manifiesto que en la naturaleza existen muchos procariotas filogenéticamente distintos que aún no se han podido cultivar.

- ✓ ¿Qué especie bacteriana importante que reside en el intestino pertenece a las Proteobacterias?
- ✓ ¿Por qué decimos que las cianobacterias prepararon la Tierra para la aparición de formas superiores de vida?
- ✓ ¿Qué es peculiar en las especies del género *Halobacterium*?
- ✓ ¿Cómo sabemos que en la naturaleza existe un grupo microbiano determinado sin haberse logrado su cultivo en el laboratorio?

2.6 Microorganismos eucarióticos

Los microorganismos eucarióticos, que en términos filogenéticos constituyen los *Eukarya*, presentan una afinidad interna por su estructura celular propia (Figura 2.1) y por su historia evolutiva. El dominio *Eukarya* (Figura 2.22) forma una larga rama que culmina con los eucariotas más recien-

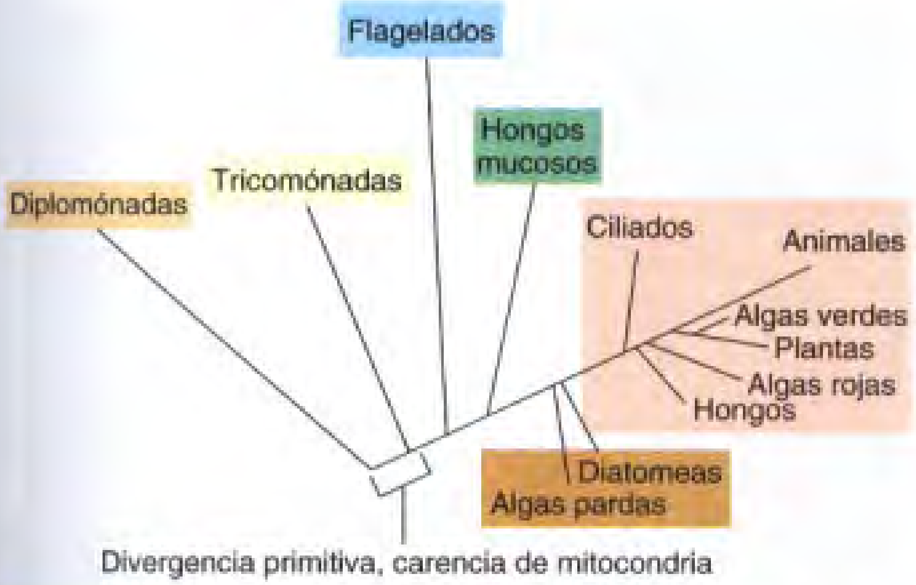


Figura 2.22 Árbol detallado de *Eukarya*. No se indican todas las ramas conocidas. Algunas especies de *Eukarya* que manifiestan divergencia temprana carecen de organelos distintos del núcleo. Nótese cómo las ramas de los organismos superiores (plantas y animales) aparecen al final del árbol.

tes, las plantas y los animales. Coincidiendo con su localización filogenética en el árbol, resulta interesante que los *Eukarya* más antiguos sean los eucariotas estructuralmente más sencillos, carecen de mitocondrias y otros orgánulos importantes. Estas células, tales como las diplomónadas del tipo *Giardia* (Figura 2.22) parecen ser las descendientes actuales de las células eucariotas primitivas que no realizaron endosimbiosis (*véanse* Secciones 2.3 y 11.3) o que por algún motivo no se asociaron de modo permanente con otro microorganismo acompañante. La mayoría de estos eucariotas primitivos presentan deficiencias metabólicas y son parásitos patógenos del hombre y de otros animales.

Como en los procariotas, existe una gran diversidad entre los eucariotas. Algunos son fototrofos, como las *algas* (Figura 2.23*a*); contienen orgánulos ricos en clorofila que se llaman *cloroplastos* y pueden vivir en medios a expensas sólo de unos cuantos minerales, CO_2 y luz. Las algas se encuentran en el suelo y en ambientes acuáticos y son los principales productores primarios en la naturaleza. Los *hongos* (Figura 2.23*b*) carecen de pigmentos fotosintéticos y son unicelulares (levaduras) o filamentosos (mohos). Los hongos son los principales agentes de biodegradación en la naturaleza y para reciclar la materia orgánica en los suelos y en otros ecosistemas.

Las células de las algas y de los hongos presentan paredes celulares, pero las de los *protozoos* no (Figura 2.23*c*). La mayoría de los protozoos son móviles y en la naturaleza muchas especies diferentes se distribuyen en hábitat acuáticos y como patógenos del hombre y de otros animales. A lo largo del árbol filogenético de los *Eukarya*, se presentan diferentes tipos de protozoos. Algunos, como los flagelados, son de aparición temprana, mientras que otros, como las especies ciliadas de *Paramecium* (Figura 2.23), son filogenéticamente posteriores (Figura 2.22). Los *hongos mucosos* se parecen a los protozoos en que son móviles y carecen de pared celular, pero difieren de ellos por su filogenia y por el hecho de que sus células pasan por un ciclo de vida en el que las células móviles se agregan formando una estructu-

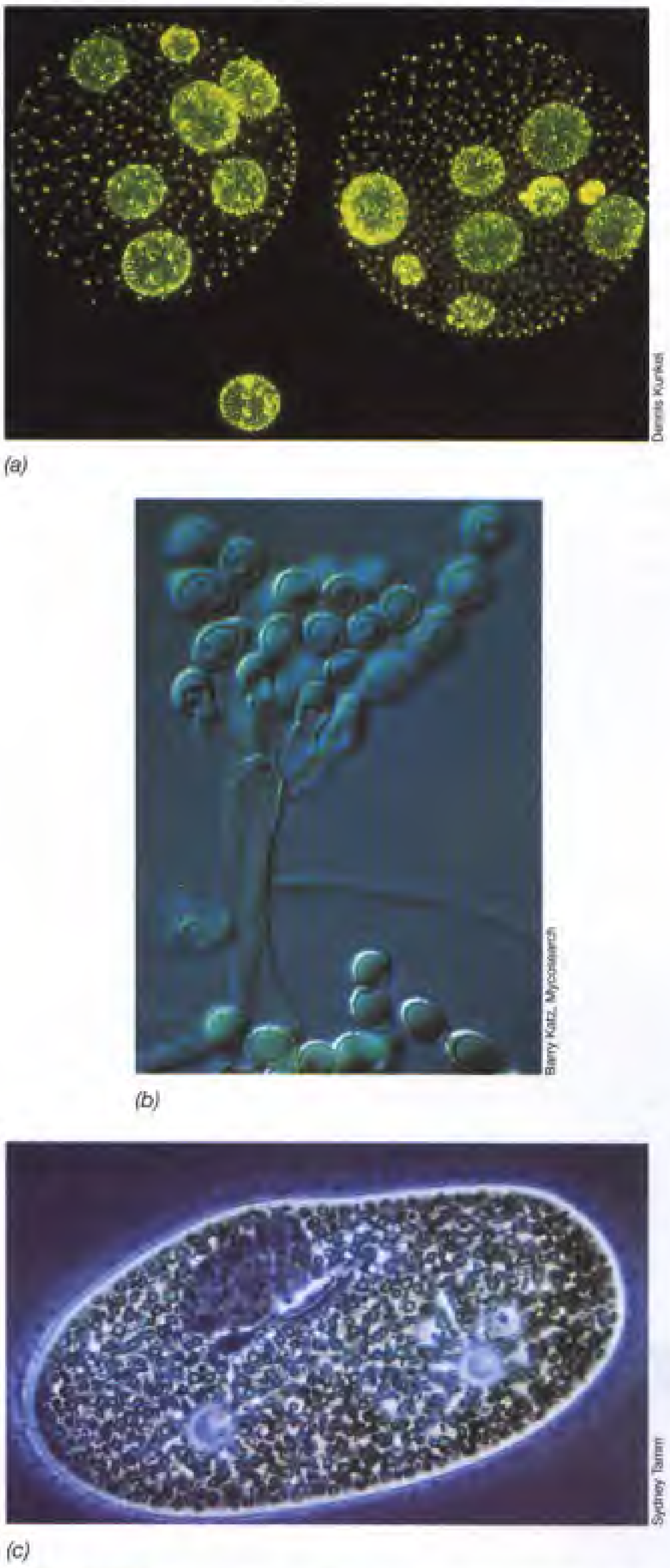


Figura 2.23 Micrografías de *Eukarya* microbianos. (a) Algas, ejemplificadas por el alga verde colonial *Volvox*. Cada célula esférica contiene varios cloroplastos, el orgánulo para la fotosíntesis de los eucariotas fototróficos. (b) Hongos, estructura productora de esporas en un hongo filamentoso típico. Cada espora da lugar a un nuevo hongo filamentoso (*véase* Sección 14.9). (c) Protozoos, el ciliado *Paramecium* (*véase* Sección 14.8). Los cilios funcionan como los motores de un barco, confiriendo movilidad a la célula.

ra pluricelular llamada cuerpo fructífero, que origina esporas que se convertirán en nuevas células móviles (*véase* Sección 14.11).

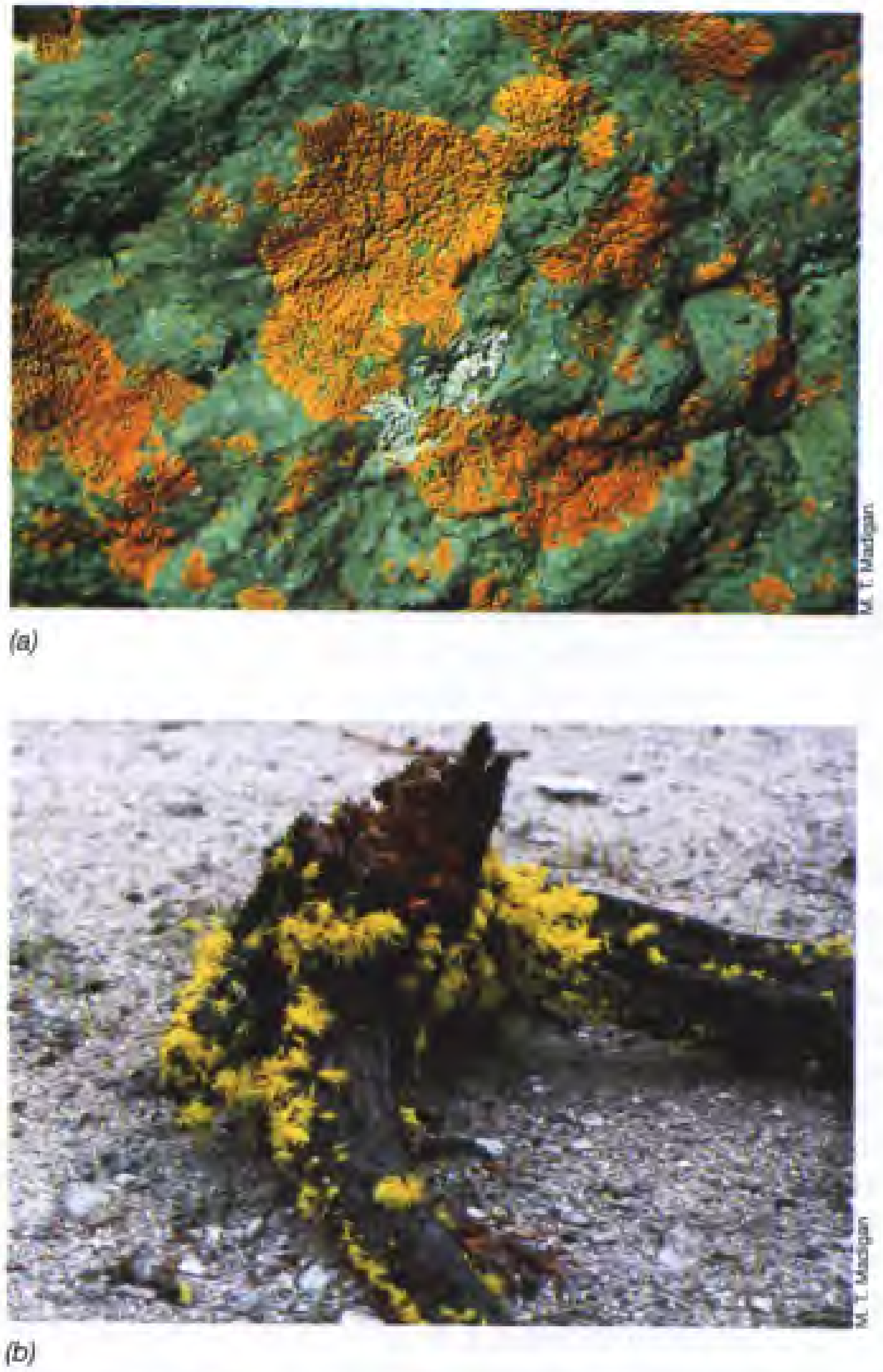
Los **líquenes** son estructuras laminares que crecen a menudo sobre rocas, árboles y otras superficies (Figura 2.24). Los líquenes son un ejemplo de *mutualismo* microbiano, una situación en la que dos organismos viven juntos para beneficio de ambos. Los líquenes están formados por un hongo y un microorganismo fototrofo, bien sea un alga (eucariota) o una cianobacteria (procariota). El componente fototrófico es el productor primario, mientras que el hongo proporciona al fototrofo tanto anclaje al sustrato como protección frente al medio. Por tanto, un líquen es un organismo dinámico que ha desarrollado con éxito una estrategia de interacción mutua entre dos organismos muy diferentes.

Este paseo por la diversidad microbiana sólo nos proprociona, por necesidades de espacio, una perspectiva general muy breve de lo que es la vida microbiana. En realidad esta historia es mucho más larga y continuará en capítulos posteriores. Los virus no han sido considerados aquí de modo intencionado, pues no son células (*véase* Sección 2.1) aunque necesitan de las células para replicarse. En todos los dominios de la vida, las células poseen parásitos víricos, y trataremos de la diversidad vírica en otros capítulos (*véanse* Capítulos 9 y 16). No obstante, primero hemos de considerar algunas características moleculares de las células, en especial de las células procarióticas. De este modo, descubriremos la gran diversidad química de los organismos vivos, lo que constituye una consecuencia directa del camino evolutivo recorrido por las células resumido en este capítulo.

✓ 2.6 Revisión de conceptos

Los microorganismos eucarióticos son un grupo diverso en el que se incluyen las algas, los hongos, los protozoos y los hongos mucosos. Algunas algas y hongos han desarrollado asociaciones mutualistas denominadas *líquenes*.

- ✓ Enumere al menos dos diferencias entre algas y cianobacterias.
- ✓ Cite al menos dos diferencias entre algas y protozoos.
- ✓ ¿Cómo se benefician mutuamente los componentes de un líquen?



M. T. Madigan

M. T. Madigan

Figura 2.24 Líquenes. (a) Un líquen anaranjado creciendo sobre una roca y (b) otro amarillo creciendo sobre un tronco de árbol en el Parque Nacional de Yellowstone, USA. El color del liquen se debe a los pigmentos del alga que forma parte de la estructura simbiótica.

Preguntas de repaso

1. ¿Por qué una célula necesita membrana citoplasmática? ¿Qué propiedades se supone que debería tener dicha membrana?
2. ¿En qué dominios aparece la estructura celular de tipo procariótico? ¿Este tipo de estructura celular indica alguna relación evolutiva?
3. ¿En qué se parecen los virus a las células? ¿En qué difieren?
4. ¿Qué significa el término *genoma*? ¿En qué se diferencia el genoma de los procariotas del de los eucariotas?
5. ¿Por qué motivo se producen en los eucariotas los procesos de mitosis y meiosis?
6. ¿Qué es la teoría de la endosimbiosis?
7. ¿Qué significa el término *filogenia*? ¿Por qué piensa que fue necesario desarrollar ciertas técnicas moleculares para estudiar la filogenia de los procariotas?
8. ¿Cuántos genes tiene un organismo como *Escherichia coli*? ¿Y si se compara con el número de genes en una de tus células?

9. ¿Qué términos se utilizan para describir los tres dominios de seres vivos? ¿Qué miembros pertenecientes a dos de los dominios son más parecidos desde el punto de vista *estructural*? ¿Y desde el punto de vista *filogenético*?
10. Estudios moleculares han puesto de manifiesto que muchas macromoléculas en las especies de *Archaea* tienen mayor homología con las de varios eucariotas que con las de especies de *Bacteria*. Explique este hecho.
11. ¿En qué se diferencian los *quimioorganotrofos* de los *quimiolitotrofos* desde el punto de vista del metabolismo energético? ¿Qué tipos de fuentes de carbono utilizan los miembros de cada grupo? Por tanto, ¿son *heterotrofos* o *autotrofos*?
12. ¿Por qué es especial el organismo *Pyrolobus*?
13. ¿Qué similitudes y qué diferencias existen entre estos tres organismos: *Pyrolobus, Halobacterium* y *Thermoplasma*?
14. Examine la Figura 2.18. ¿Qué significa la línea «Env-marina»?

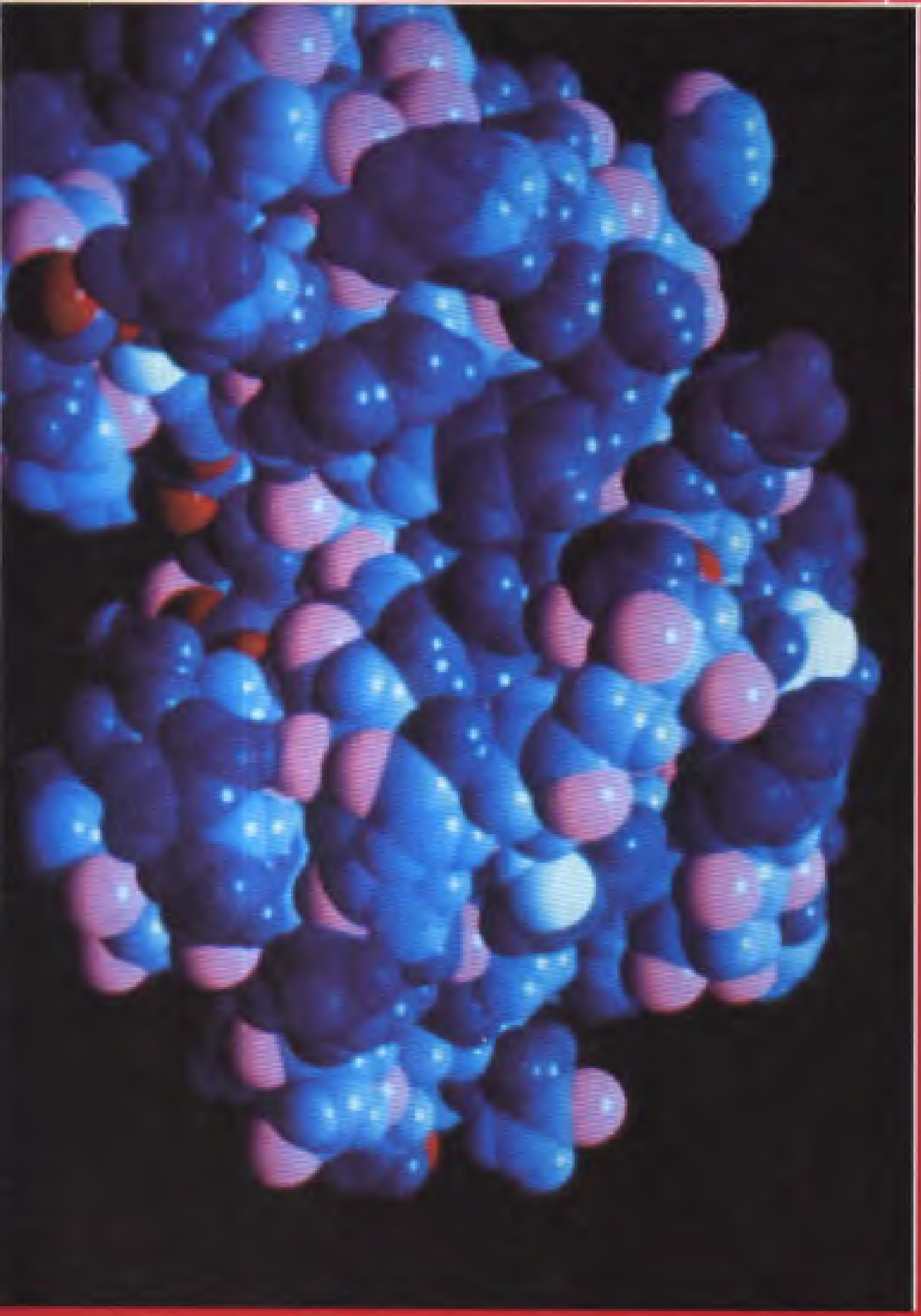
Ejercicios prácticos

1. Las células procarióticas que contienen plásmidos se pueden «curar» de esos plásmidos (es decir, se pueden eliminar sus plásmidos de ellas de forma permanente) sin efectos indeseables, mientras que la eliminación del cromosoma es letal. Explique la razón.
2. El conocimiento de la evolución de los *macroorganismos* precedió en mucho al de los *microorganismos*.¿Por qué la reconstrucción de la evolución de los caballos, por ejemplo, parece una cuestión más sencilla que hacer lo mismo con las bacterias?
3. Examine el árbol filogenético que se muestra en la Figura 2.6. Usando los datos de la secuencia que se muestra, describa por qué el árbol sería incorrecto si se mantuviese la misma forma pero se cambiase la posición de los organismos 2 y 3 en el árbol?
4. Los microbiólogos han cultivado una gran variedad de microorganismos pero saben que la diversidad es mucho mayor pese a que no ha sido posible cultivar esos microorganismos en el laboratorio. Explique este hecho.
5. ¿Qué datos de este capítulo podría utilizar para convencer a sus amigos de que los extremófilos no son únicamente organismos que «resisten» las condiciones de sus hábitat respectivos?
6. Defienda este argumento: si las cianobacterias no hubiesen evolucionado, la vida en la Tierra habría permanecido estrictamente microbiana.

Las células están integradas por macromoléculas altamente organizadas. Estas moléculas tan diversas desde el punto de vista químico incluyen los polisacáridos, los lípidos, los ácidos nucleicos y las proteínas. Las proteínas, cuyo modelo molecular se muestra aquí, además de desempeñar un papel estructural en la célula funcionan a menudo como catalizadores llamados enzimas. La estructura de las macromoléculas determina en gran medida su función. Por tanto, el conocimiento de la estructura macromolecular es importante para comprender las funciones celulares que se describirán en los capítulos posteriores.

3

MACROMOLÉCULAS



I EL ENLACE QUÍMICO Y EL AGUA EN LOS SISTEMAS VIVOS 39

3.1 Enlaces fuertes y débiles 39
3.2 Las macromoléculas y el agua como solvente de vida 42

II MACROMOLÉCULAS 43

3.3 Polisacáridos 43
3.4 Lípidos 45
3.5 Ácidos nucleicos 46
3.6 Aminoácidos y enlace peptídico 48
3.7 Proteínas: estructuras primaria y secundaria 50
3.8 Proteínas: estructuras de orden superior y desnaturalización 52

Glosario

Apolar que posee características hidrofóbicas (repulsión al agua) y se disuelve difícilmente en agua

Desnaturalización eliminación del plegamiento correcto de una proteína que conduce (generalmente) a la pérdida de la actividad biológica

Enantiomorfo una forma de una molécula que es la imagen especular de otra forma de la misma molécula

Enlace covalente un tipo de enlace químico en el que dos atómos comparten electrones

Enlace fosfodiéster un tipo de enlace covalente que une a los nucleótidos de un polinucleótido

Enlace glicosídico un tipo de enlace covalente que une monosacáridos para formar un polisacárido

Enlace peptídico un tipo de enlace covalente entre los aminoácidos de un polipéptido

Estructura primaria la secuencia precisa de las unidades monoméricas en una macromolécula portadora de información, como por ejemplo en un polipéptido

Estructura secundaria el modo inicial de plegamiento de un polipéptido o polinucleótido, normalmente dependiente de las posibilidades de establecer puentes de hidrógeno

Estructura terciaria el plegamiento final de un polipéptido que previamente ha adoptado su estructura secundaria

Estructura cuaternaria el número y disposición de los polipéptidos individuales en la molécula final de una proteína

Lípido glicerol unido a ácidos grasos o a otras moléculas hidrofóbicas por enlace éster o éter. A menudo, también contiene otros grupos, como fosfato

Macromolécula polímero formado por monómeros unidos covalentemente

Molécula dos o más átomos unidos químicamente entre sí

Nucleósido un nucleótido sin su grupo fosfato

Nucleótido un monómero de un ácido nucleico que contiene una base nitrogenada (adenina, guanina, citosina, timina o uracilo), una molécula de fosfato y un azúcar, bien sea ribosa (en el RNA) o desoxirribosa (en el DNA)

Polar que posee propiedades hidrofílicas y es generalmente soluble en agua

Polímero un compuesto químico formado por polimerización y que consta de unidades repetitivas llamadas monómeros

Polinucleótido un polímero de nucleótidos unidos entre sí por enlaces fosfodiéster

Polipéptido un polímero de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos

Polisacárido un polímero de monosacáridos unidos entre sí por enlaces glicosídicos

Proteína un polipéptido o grupo de polipéptidos que forman una molécula con una función biológica específica

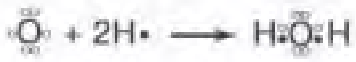
Puente de hidrógeno un enlace químico débil entre un átomo de hidrógeno y un segundo elemento más electronegativo, normalmente un átomo de oxígeno o de nitrógeno

I EL ENLACE QUÍMICO Y EL AGUA EN LOS SISTEMAS VIVOS

Para entender la microbiología y cómo funcionan las células, se debe saber algo de las moléculas presentes y de los procesos químicos que ocurren en el interior de las células. Las moléculas, especialmente las *macromoléculas*, son la «esencia de las células» y el tema fundamental de este capítulo. Se supone que el lector tiene ya algunas nociones de química elemental sobre la naturaleza de los átomos y los enlaces entre ellos. En este capítulo ampliaremos dichos conocimientos presentando primero los enlaces químicos más importantes y, a continuación, una exposición detallada de la estructura y función de las cuatro clases de macromoléculas: **polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos** y **proteínas**.

3.1 Enlaces fuertes y débiles

Los principales elementos químicos para la vida son hidrógeno, oxígeno, carbono, nitrógeno, fósforo y azufre; éstos se pueden unir de varias maneras para formar las moléculas de la vida. ¿Qué es una molécula? Una **molécula** son dos o más átomos unidos químicamente entre sí. Por ejemplo, dos átomos de oxígeno (O) se combinan para formar una molécula de oxígeno (O_2). Los elementos químicos de la vida son capaces de formar enlaces fuertes en los que los electrones son compartidos más o menos equitativamente entre los átomos; éstos se denominan **enlaces covalentes**. Para imaginar un enlace covalente, consideremos la formación de una molécula de agua a partir de sus elementos constituyentes, O y H:

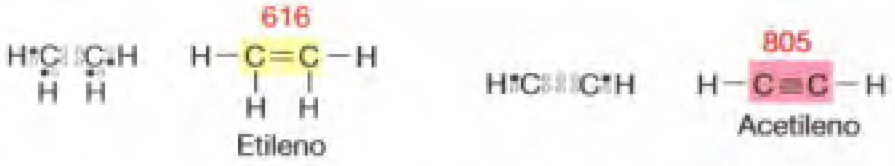


$$\cdot\underset{\cdot\cdot}{\overset{\cdot\cdot}{O}}\cdot + 2H\cdot \longrightarrow H\!:\!\underset{\cdot\cdot}{\overset{\cdot\cdot}{O}}\!:\!H$$

El oxígeno contiene seis electrones en su capa más externa mientras que el hidrógeno tiene un solo electrón. Cuando se combinan para formar H_2O lo hacen por medio de enlaces covalentes que mantienen los tres átomos en una asociación fuerte. De modo similar, y dependiendo de los elementos, se pueden formar enlaces covalentes dobles o triples y la fuerza de estos enlaces aumenta notablemente cuando aumenta su número (Figura 3.1).

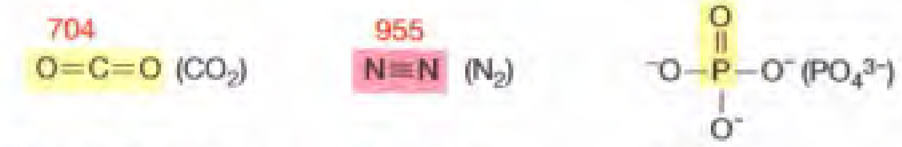
Puentes de hidrógeno y otras asociaciones débiles

Además de los enlaces covalentes, varios enlaces químicos mucho más débiles tienen también un papel importante en las moléculas biológicas. Entre éstos los más importantes son los enlaces de hidrógeno o **puentes de hidrógeno**. Los puentes de hidrógeno (Figura 3.2) se forman entre átomos de hidrógeno y elementos más electronegativos, como el oxígeno o el nitrógeno. Un solo puente de hidrógeno es un enlace muy débil, pero cuando se forman muchos puentes de hidrógeno intramolecularmente o entre moléculas distintas la estabilidad de las moléculas aumenta de modo notable.



Etileno, un compuesto orgánico con doble enlace

Acetileno, un compuesto orgánico con triple enlace

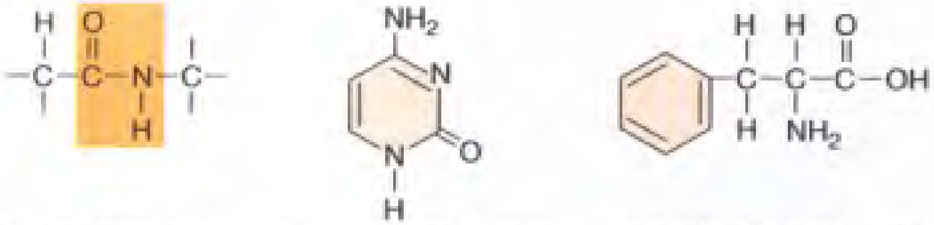


Dióxido de carbono

Nitrógeno

Fosfato

Algunos compuestos inorgánicos con dobles o triples enlaces



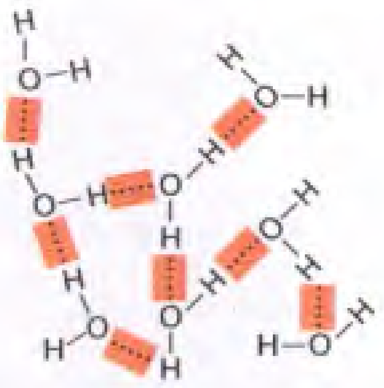
Enlace peptídico de proteínas

Citosina (base nitrogenada del DNA y RNA)

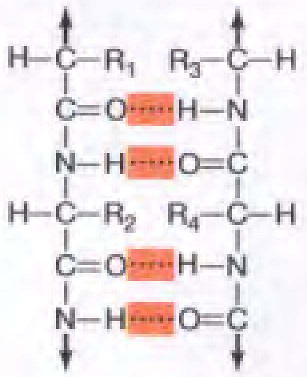
Fenilalanina (aminoácido en proteínas)

Compuestos orgánicos con dobles enlaces

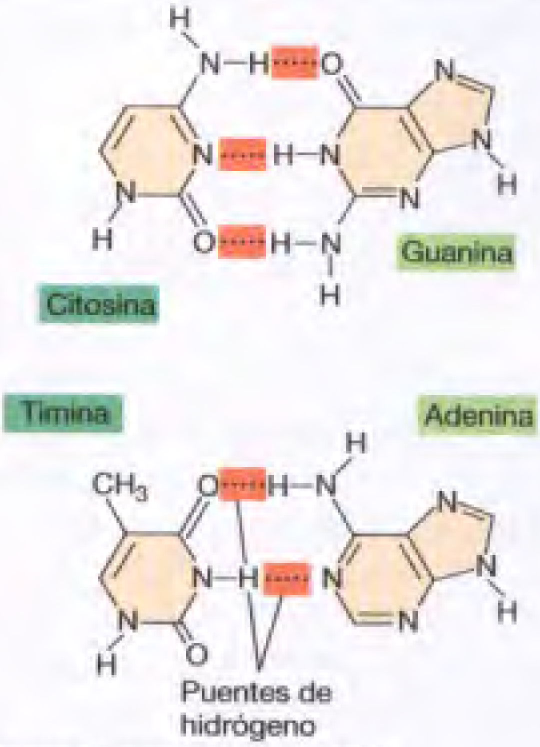
Figura 3.1 Enlace covalente de algunas moléculas con importancia biológica que presentan doble o triple enlace. En el caso del acetileno y del etileno se señala la configuración electrónica de las moléculas. La fuerza del enlace se indica numéricamente en kilojulios (kJ), que es la cantidad de calor necesaria para romper un enlace.



(a) Agua.



(b) Aminoácidos en una cadena proteica. R representa la cadena lateral de cada aminoácido.



(c) Bases nitrogenadas en el DNA.

Figura 3.2 Puentes de hidrógeno. Los puentes de hidrógeno en los ácidos nucleicos se indican a menudo como líneas en vez de puntos, con dos líneas entre los pares adenina/timina y tres líneas entre los pares guanina/citosina (*véase* Figura 3.11).

Las moléculas de agua establecen puentes de hidrógeno (Figura 3.2*a*), lo que contribuye a la conocida *polaridad* del agua. Como un átomo de oxígeno es más bien electronegativo (secuestrador de electrones), mientras que un átomo de hidrógeno no lo es, el enlace covalente entre ambos es tal que los electrones compartidos en sus capas más externas tienen en realidad órbitas más próximas al núcleo del oxígeno que al del hidrógeno. Debido a que los electrones tienen carga negativa, esto origina una cierta separación de carga, con el oxígeno más negativo y el hidrógeno más positivo (Figura 3.2*a*). Como las moléculas de agua se orientan en solución, la débil carga positiva del átomo de hidrógeno permite establecer uniones con las cargas negativas de los dos átomos de oxígeno; estas uniones son los *puentes de hidrógeno*. Los puentes de hidrógeno también se forman en las macromoléculas (Figura 3.2*b* y *c*). Cuando estas fuerzas eléctricas débiles se acumulan en una molécula grande, como una proteína, mejoran la estabilidad de la molécula y afectan a su estructura global. Más adelante veremos que los puentes de hidrógeno son muy importantes en la determinación de las propiedades biológicas de las macromoléculas, especialmente en el caso de las proteínas (Figura 3.2*b*) y de los ácidos nucleicos (Figura 3.2*c*) (*véanse* Secciones 3.5, 3.7 y 3.8).

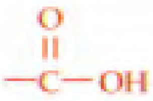
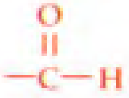
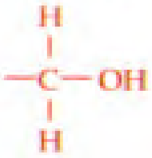
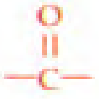
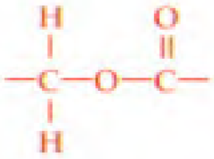
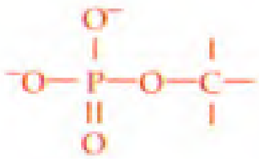
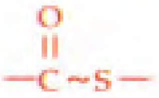
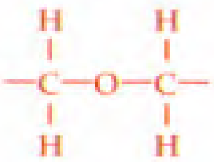
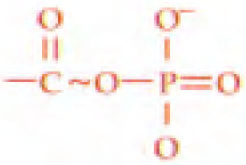
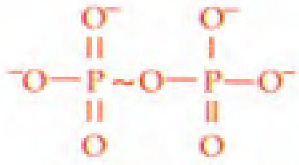
Las biomoléculas presentan otro tipo de interacciones débiles. Por ejemplo, las *fuerzas de van der Waals* son atracciones débiles que ocurren cuando los átomos se encuentran a una distancia menor de 3-4 angstroms (Å). El efecto de estas fuerzas puede ser importante en la unión entre los sustratos y las enzimas (*véase* Sección 5.5) y en las interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos.

Las *interacciones hidrofóbicas* también son importantes en las biomoléculas. Las interacciones hidrofóbicas ocurren debido a que las moléculas no polares (que repelen el agua) tienden a juntarse en un ambiente acuoso. En consecuencia, las porciones más apolares de una macromolécula se asocian en tales condiciones. Las interacciones hidrofóbicas determinan los modos de plegamiento de las proteínas y, junto con las fuerzas de van der Waals, también son importantes en la unión entre sustratos y enzimas. Además, este tipo de interacción controla a menudo el modo en que se asocian las diferentes subunidades en una proteína compleja para formar una molécula biológicamente activa.

Modelos de unión en las biomoléculas

El **carbono** es el elemento principal de todas las macromoléculas. El carbono es capaz de combinarse no sólo consigo mismo, sino también con muchos otros elementos para formar grandes estructuras de una diversidad y complejidad considerables. En los distintos compuestos orgánicos (que contienen carbono), aparecen con cierta frecuencia diversas combinaciones químicas cuyo conocimiento hará más fácil la comprensión de la estructura molecular, la fisiología y la biosíntesis. La Tabla 3.1 presenta varios de estos modelos de unión y las moléculas y macromoléculas en las que aparecen con mayor frecuencia. Cada uno de estos *grupos funcionales*, que es como se denominan, tiene propiedades químicas únicas y pueden ser importantes en sus funciones biológicas en la célula.

TABLA 3.1 Grupos funcionales de importancia bioquímica

Especies químicas	Estructura[a]	Importancia biológica
Ácido carboxílico	 $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-OH$	Ácidos orgánicos, aminoácidos y ácidos grasos; lípidos y proteínas
Aldehído	 $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-H$	Grupo funcional de azúcares reductores como glucosa y polisacáridos
Alcohol	 $-\underset{H}{\overset{H}{C}}-OH$	Lípidos y carbohidratos
Ceto	 $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-$	Piruvato, intermediarios del ciclo del ácido cítrico
Éster	 $-\underset{H}{\overset{H}{C}}-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-$	Lípidos de *Bacteria* y *Eukarya* y unión de los aminoácidos a los RNAs de transferencia
Éster fosfato	 $^{-}O-\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{O^-}{P}}-O-\underset{\mid}{\overset{\mid}{C}}-$	Ácidos nucleicos, DNA y RNA
Tioéster	 $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim S-$	Metabolismo energético y biosíntesis de ácidos grasos
Éter	 $-\underset{H}{\overset{H}{C}}-O-\underset{H}{\overset{H}{C}}-$	Lípidos de *Archaea* y esfingolípidos
Anhídrido ácido	 $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim O-\underset{O}{\overset{O^-}{P}}=O$	Metabolismo energético, por ejemplo, acetil fosfato
Fosfoanhídrido	 $^{-}O-\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{O^-}{\overset{\|}{P}}}\sim O-\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{O^-}{P}}-O^-$	Metabolismo energético, por ejemplo, ATP

[a] Un enlace (~) indica enlace de «alta energía» (*véase* Sección 5.8).

✓ 3.1 Revisión de conceptos

Los enlaces covalentes son uniones fuertes que mantienen unidos los elementos en las macromoléculas. Los enlaces débiles, como los puentes de hidrógeno, las fuerzas de van der Waals, y las interacciones hidrofóbicas también afectan a la estructura macromolecular, pero a través de interacciones atómicas más sutiles. Diversos grupos funcionales que contienen carbono son frecuentes en las biomoléculas importantes.

- ✓ ¿Por qué son más fuertes los enlaces *covalentes* que los *puentes de hidrógeno*?
- ✓ ¿Cómo puede un puente de hidrógeno desempeñar una función en el establecimiento de la estructura de una macromolécula?

3.2 Las macromoléculas y el agua como solvente de la vida

Si procediéramos a la disección bioquímica de una célula procariótica, como la bacteria intestinal *Escherichia coli*, encontraríamos que el componente principal es el agua y que después de ésta se encuentran grandes cantidades de *macromoléculas*, cantidades menores de *monómeros* precursores de las macromoléculas y varios iones inorgánicos (Tabla 3.2). De hecho, el 96% del peso seco de una célula es debido a las macromoléculas y, dentro de éstas, las proteínas son con mucho las más abundantes (Tabla 3.2). Las **proteínas** son polímeros cuyos monómeros son los *aminoácidos*. Las proteínas se encuentran por toda la célula y tienen tanto funciones estructurales como catalíticas (enzimáticas) (Figura 3.3*a*).

TABLA 3.2 Composición química de una célula procariótica[a]

Molécula	Porcentaje de peso seco[b]	Moléculas por célula (clases diferentes)
Macromoléculas totales	96	24 610 000 (–2500)
Proteína	55	2 350 000 (–1850)
Polisacárido	5	4300 (2)[c]
Lípido	9,1	22 000 000 (4)[d]
Lipopolisacárido	3,4	1 430 000 (1)
DNA	3,1	2,1 (1)
RNA	20,5	255 500 (–660)
Monómeros totales	3,0	—[e] (–350)
Aminoácidos y precursores	0,5	— (–100)
Azúcares y precursores	2	— (–50)
Nucleótidos y precursores	0,5	— (–200)
Iones inorgánicos	1	— (18)
Total	100%	—

[a] Datos tomados de Neidhardt, F.C., *et al.* (eds.), 1996. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium—Cellular and Molecular Biology*, 2nd edition. American Society for Microbiology, Washington DC.

[b] Peso seco de una célula en crecimiento de *E. coli*, aproximadamente 2,8 × 10-13 g; peso total (70% agua) = 9,5 × 10^{-13} g.

[c] Considerando que el peptidoglicano y el glucógeno son los principales polisacáridos presentes.

[d] Existen varias clases de fosfolípidos, cada una con diferentes tipos debido a la variabilidad en la composición de los ácidos grasos entre las distintas especies y a las diferentes condiciones de crecimiento.

[e] No existen estimaciones fiables en cuanto a la composición de monómeros e iones inorgánicos.

Los **ácidos nucleicos** son polímeros de nucleótidos y en la célula se encuentran dos tipos, **RNA** y **DNA**. Después de las proteínas, el ácido ribonucleico (RNA) es el tipo de macromolécula más abundante en una célula procariótica en crecimiento (Tabla 3.2 y Figura 3.3*b*). Esto se debe a que en cada célula hay miles de ribosomas (las «máquinas» que fabrican nuevas proteínas) y los ribosomas se componen de RNA y proteínas. Además están presentes cantidades menores de RNA en forma de RNAs mensajeros y de transferencia, que también participan en la síntesis de proteínas. A diferencia del RNA, el DNA es relativamente insignificante (en peso) de la célula bacteriana (Tabla 3.2). Sin embargo, aunque cuantitativamente es un componente minoritario, el DNA es, por supuesto, un componente clave para las funciones celulares como depositario de la información genética necesaria para hacer una nueva célula.

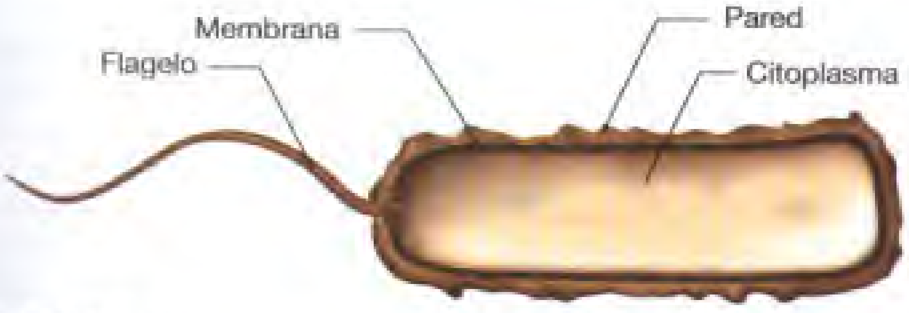
Los **lípidos** tienen propiedades hidrofóbicas (repelen el agua) y tienen funciones críticas en la estructura de las membranas y como depósitos de almacenamiento del exceso carbono (Figura 3.3*d*). Los **polisacáridos** son polímeros compuestos por *azúcares* y están presentes fundamentalmente en la pared celular; no obstante, como en el caso de los lípidos, hay polisacáridos como el glucógeno (*véase* más adelante en este capítulo) que pueden ser formas de almacenamiento de carbono y energía dentro de la célula (Figura 3.3*c*).

El agua como solvente biológico

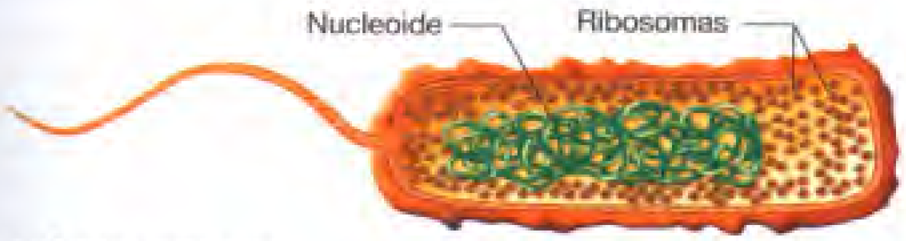
En las células, las macromoléculas y las moléculas están inmersas en agua. El agua tiene propiedades químicas destacables que la convierten en un solvente biológico ideal. Por ello, el agua es un requisito imprescindible para la vida tal como la conocemos. Las propiedades más importantes del agua, que la hacen ser un solvente tan bueno, son su *polaridad* y su *cohesión*.

Las propiedades polares del agua son importantes porque muchas moléculas biológicas son a su vez polares y, por lo tanto, se disuelven fácilmente en agua. Como veremos en el Capítulo 4, las sustancias en disolución pasan continuamente hacia dentro o hacia fuera de la célula mediante transporte a través de la membrana citoplasmática (*véanse* Secciones 4.6 y 4.7). Las propiedades polares también favorecen la formación de puentes de hidrógeno. El agua forma mallas tridimensionales consigo misma (Figura 3.2*a*) y dentro de las macromoléculas, con lo que ayuda a situar los átomos de las biomoléculas para posibles interacciones. Por otra parte, la elevada polaridad del agua, también es beneficiosa porque facilita que las sustancias *apolares* se agreguen y permanezcan juntas. Por ejemplo, las membranas contienen grandes cantidades de macromoléculas apolares como los lípidos, y éstos tienden a agregarse de tal modo que impiden el libre flujo de las moléculas polares hacia el interior o hacia el exterior de la célula.

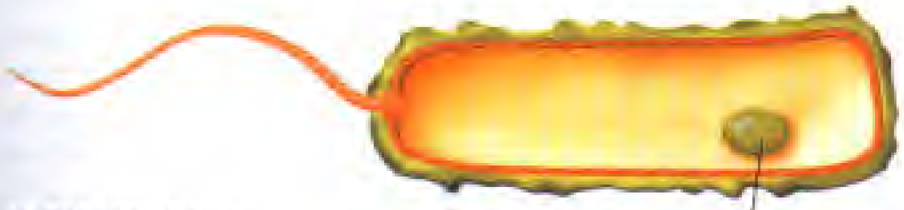
Además de formar puentes de hidrógeno, la naturaleza polar del agua la convierte en altamente cohesiva, lo que significa que las moléculas de agua muestran una elevada afinidad mutua y se disponen formando estructuras ordenadas en las que los puentes de hidrógeno (Figura 3.2) están continuamente formándose, deshaciéndose y volviéndose a for-



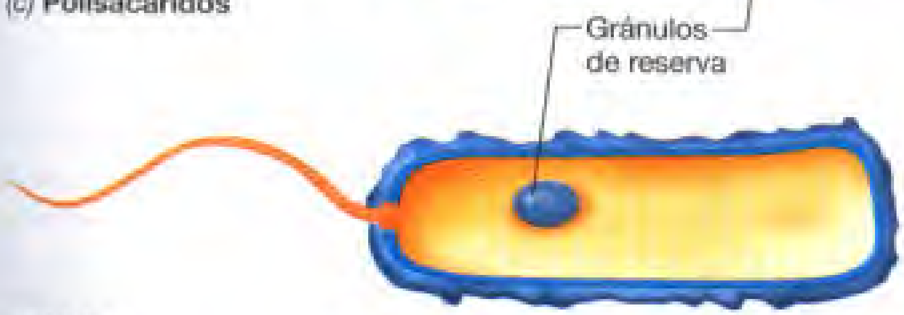
(a) **Proteínas**



(b) **Ácidos nucleicos**



(c) **Polisacáridos**



(d) **Lípidos**

Figura 3.3 Localización de las macromoléculas en la célula. (a) Las *proteínas* (marrón) se encuentran por toda la célula formando parte de las estructuras celulares y de las enzimas. El flagelo es una estructura relacionada con la movilidad. (b) *Ácidos nucleicos*. El DNA (verde) se encuentra en el nucleoide de las células procarióticas y en el núcleo de células eucarióticas. El RNA (naranja) se encuentra en el citoplasma (RNAm y RNAt) y en los ribosomas (RNAr). (c) Los *polisacáridos* (amarillo) se localizan en la pared celular y, en ocasiones, en gránulos de reserva internos. (d) Los *lípidos* (azul) se localizan en la membrana citoplasmática, la pared celular y en gránulos de reserva. Nótese el código de colores utilizado; a lo largo de este libro se utilizarán los mismos colores para referirse a estas macromoléculas. Para el DNA, véase también la leyenda de la Figura 3.11.

mar. La naturaleza cohesiva del agua es la responsable de muchas de sus importantes propiedades biológicas, como la *alta tensión superficial* y el *elevado calor específico* (calor requerido para elevar la temperatura 1°C). Además, el hecho de que el agua se expanda por congelación y produzca una forma sólida menos densa (hielo) tiene profundos efectos sobre la vida en los ambientes acuáticos. Por ejemplo, el hielo superficial en un lago puede aislar al agua que está debajo y evitar su congelación, permitiendo así sobrevivir a los organismos acuáticos pese a la capa de hielo superficial.

La vida se originó en el agua y, en cualquier parte donde exista agua líquida en la Tierra, es probable que se encuentren microorganismos (describiremos algunos ejemplos espectaculares en la Sección 10.6 y en el Capítulo 13). Veamos ahora la estructura de las principales macromoléculas de los sistemas vivos (Tabla 3.2).

✓ 3.2 Revisión de conceptos

Las proteínas representan la clase de macromoléculas más abundante en las células. Otras macromoléculas son los ácidos nucleicos (DNA y RNA), los lípidos, los polisacáridos y los lipopolisacáridos. El agua es un solvente particularmente ideal para los organismos vivos debido a su polaridad y a su cohesión.

- ✓ ¿Por qué el RNA constituye una proporción tan grande de una célula en crecimiento?
- ✓ ¿Por qué la elevada polaridad del agua es la causa de su utilidad como solvente biológico?

II MACROMOLÉCULAS

Analizaremos las macromoléculas señaladas en la Tabla 3.2 y examinaremos los componentes de cada una de ellas.

3.3 Polisacáridos

Los **carbohidratos** (azúcares) son compuestos orgánicos que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno en la proporción 1:2:1. La fórmula estructural de la glucosa, el más abundante de todos los azúcares, es $C_6H_{12}O_6$ (Figura 3.4). Los carbohidratos con mayor importancia biológica son los que contienen 4, 5, 6 y 7 átomos de carbono (designados como C_4, C_5, C_6 y C_7). Los azúcares C_5 (pentosas) tienen una especial importancia por formar parte de la estructura de los ácidos nucleicos. De modo similar, los C_6 (hexosas) son los monómeros constituyentes de los polímeros de la pared celular y de los que actúan como reserva de energía. La Figura 3.4 muestra las fórmulas estructurales de unos cuantos azúcares comunes.

A partir de los carbohidratos simples se pueden formar derivados reemplazando uno o más de los grupos hidroxilo por otras especies químicas. Por ejemplo, el **peptidoglicano**, que es un polímero importante de la pared celular bacteriana (*véase* Sección 4.8), contiene un derivado de la glucosa, la N-acetilglucosamina (Figura 3.5). Además de sus derivados, los azúcares pueden tener una misma fórmula *estructural* y sin embargo diferir en sus *propiedades estereoisoméricas* (*véase* Sección 3.6). Por tanto, la célula dispone de un gran número de azúcares diferentes y potencialmente disponibles para la construcción de los polisacáridos.

El enlace glicosídico

Los **polisacáridos** son hidratos de carbono que contienen muchas unidades monoméricas (a veces cientos e incluso miles) unidas por enlaces covalentes llamados **enlaces glicosídicos** (Figura 3.6). (*N. del R.* Se denomina enlace glucosídico cuando todos los monómeros son de glucosa exclusivamente; y enlace glicosídico si el enlace se estable-

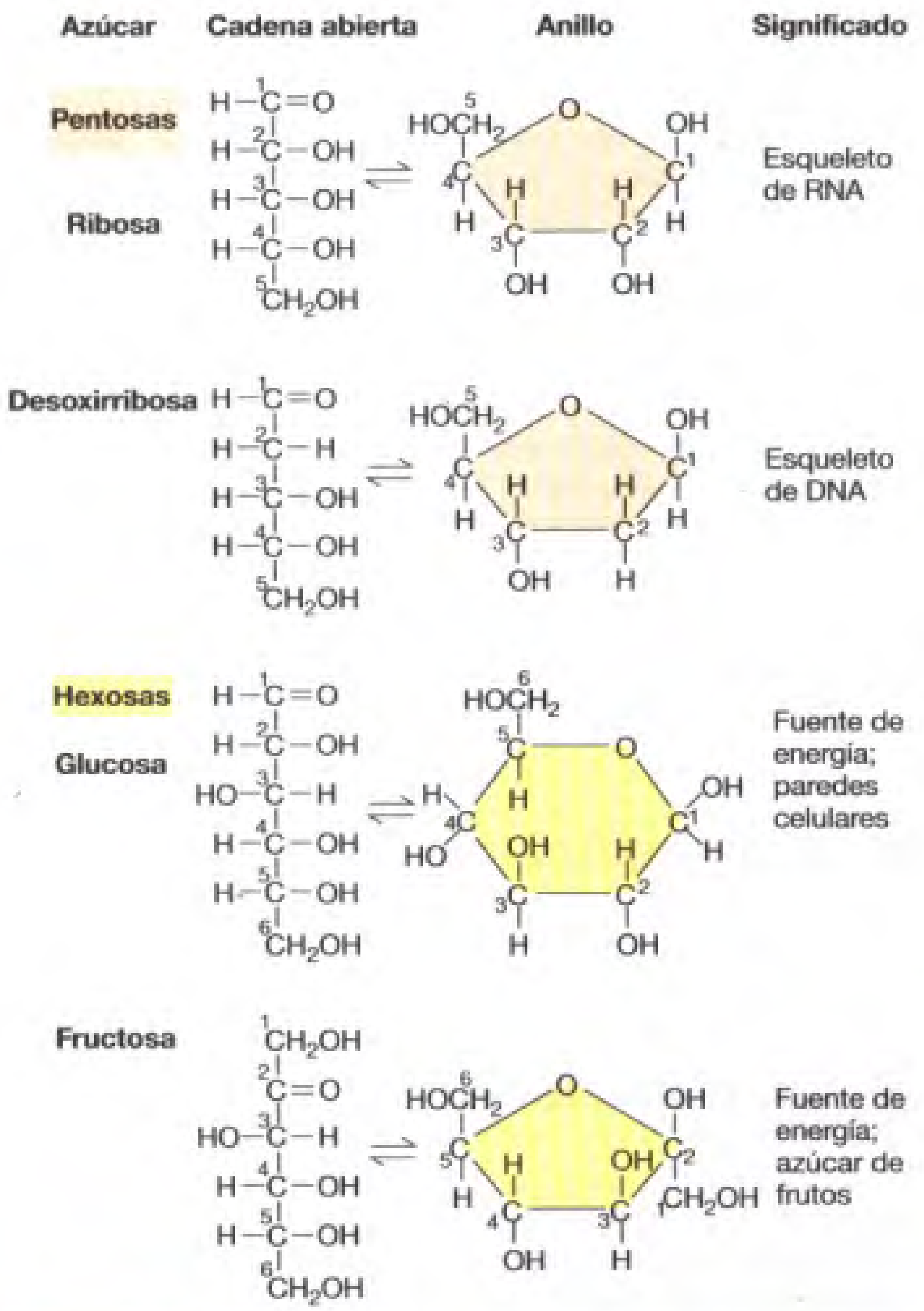

Azúcar
Cadena abierta
Anillo
Significado
Pentosas
Ribosa
Esqueleto de RNA
Desoxirribosa
Esqueleto de DNA
Hexosas
Glucosa
Fuente de energía; paredes celulares
Fructosa
Fuente de energía; azúcar de frutos

Figura 3.4 Fórmulas estructurales de algunos azúcares habituales. Las fórmulas se pueden representar de dos modos alternativos, como cadena lineal y como anillo. La cadena lineal es más fácil de visualizar, pero la forma de anillo es la estructura usada comúnmente. Adviértase el sistema de numeración en el anillo.

ce entre diversos hidratos de carbono además de la glucosa.) Si dos azúcares (monosacáriodos) se unen por un enlace glicosídico se forma un *disacárido*. La adición a esta molécula de otro monosacárido origina un *trisacárido* y cuando son varios más, un *oligosacárido;* una cadena muy larga de este tipo se denomina un **polisacárido**.

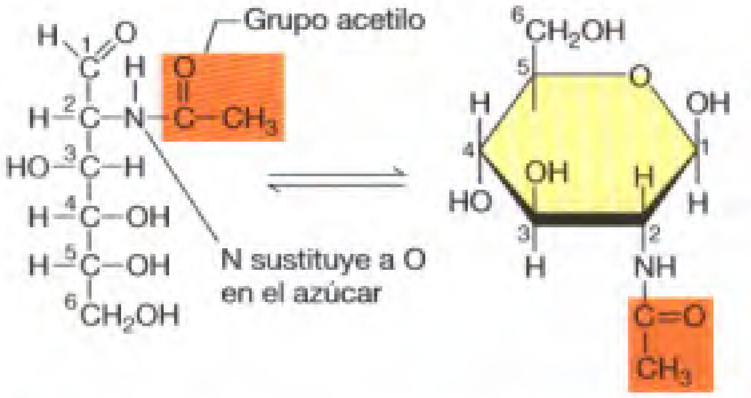

Grupo acetilo
N sustituye a O en el azúcar

Figura 3.5 *N*-acetilglucosamina, un derivado de un azúcar.

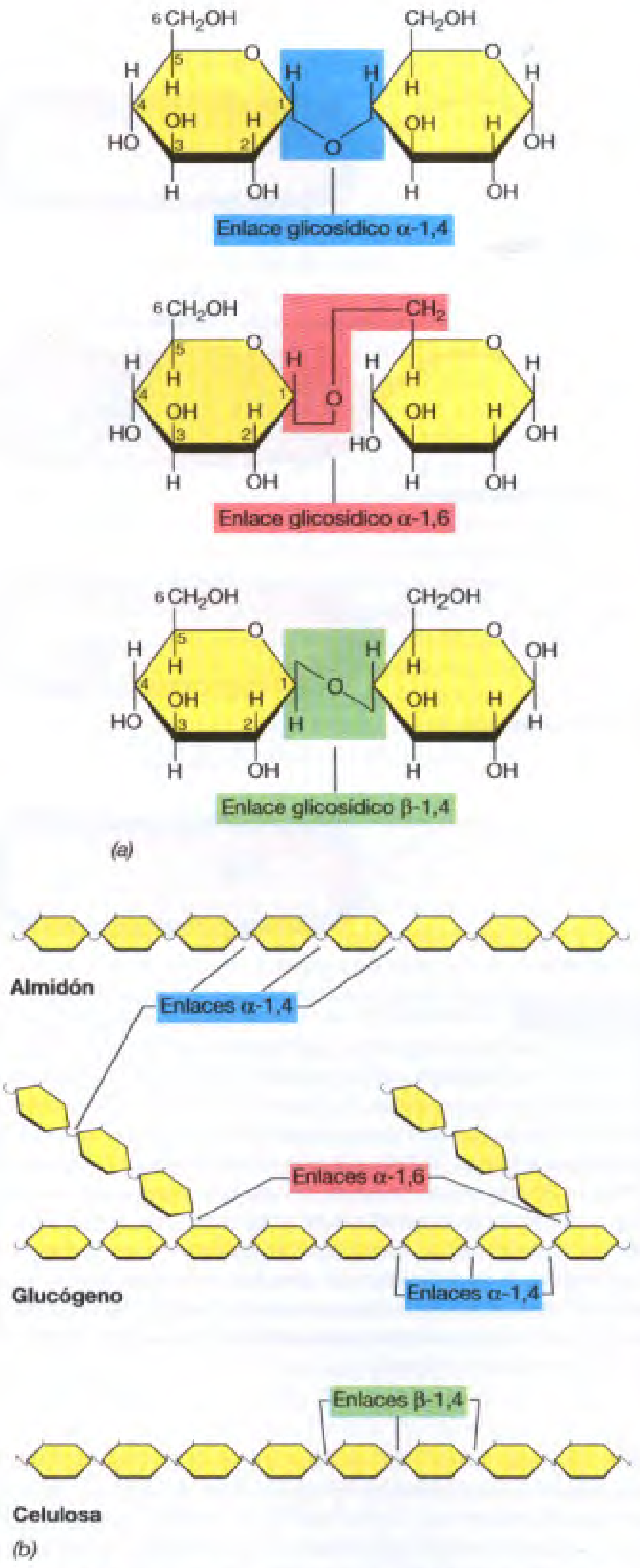

Enlace glicosídico α-1,4
Enlace glicosídico α-1,6
Enlace glicosídico β-1,4
(a)
Almidón
Enlaces α-1,4
Enlaces α-1,6
Glucógeno
Enlaces α-1,4
Enlaces β-1,4
Celulosa
(b)

Figura 3.6 Polisacáridos. (a) Estructura de diversos enlaces glicosídicos. En el enlace glicosídico puede variar tanto la *unión* como la *geometría* de la unión (α o β). (b) Estructuras de algunos polisacáridos habituales. El color se corresponde con el usado en (a).

El enlace glicosídico puede presentar dos orientaciones, llamadas alfa (α) y beta (β) (Figura 3.6*a*). Los polisacáridos con unidades repetitivas de glucosa unidas entre los carbonos 1 y 4 en orientación de tipo *alfa* (por ejemplo, el glucógeno y el almidón, Figura 3.6*b*) funcionan como reservas importantes de carbono y energía en bacterias, plantas y animales. Alternativamente, las unidades de glucosa unidas por enlace *beta*-1,4 forman la celulosa (Figura 3.6*b*), un componente rígido de la pared celular de las plantas y de las algas. Así, aunque tanto el almidón como la celulosa se componen en ambos casos solamente de unidades de glucosa, sus propiedades funcionales son completamente diferentes debido a las diferentes configuraciones, α y β, de sus enlaces glucosídicos. Los polisacáridos se pueden combinar también con otras clases de macromoléculas, como proteínas y lípidos, formando polisacáridos complejos del tipo de las **glicoproteínas** y los **glicolípidos**, respectivamente. Estos compuestos tienen funciones fundamentales en las membranas celulares como moléculas receptoras de superficie y residen en la cara externa de la membrana, en contacto con el medio ambiente. Los glicolípidos también constituyen una fracción importante de la pared celular de las bacterias Gram negativas y a ellos se deben algunas propiedades de las superficies de estos microorganismos (*véase* Sección 4.9).

✓ 3.3 Revisión de conceptos

Los azúcares se combinan para formar largos polímeros llamados polisacáridos. Las dos orientaciones diferentes de los enlaces glicosídicos que unen las unidades de azúcares confieren propiedades diferentes a las moléculas resultantes. Los polisacáridos pueden contener también otras moléculas como proteínas o lípidos originando polisacáridos complejos.

✓ ¿Por qué difieren tanto el glucógeno y la celulosa en sus propiedades físicas pese a que ambos están formados al 100% por glucosa?

3.4 Lípidos

Los **ácidos grasos** son los principales constituyentes de los **lípidos** de *Bacteria* y *Eukarya*. Los lípidos de *Archaea*, por el contrario, contienen la molécula hidrofóbica fitano (*véase* Sección 4.5). Los ácidos grasos tienen propiedades químicas interesantes debido a que contienen regiones muy hidrofóbicas (que repelen el agua) y otras muy hidrofílicas (solubles en agua). El palmitato*, por ejemplo (Figura 3.7) es un ácido graso de 16 átomos de carbono que contine una cadena saturada (totalmente hidrogenada) de 15 átomos de carbono y un sólo grupo de ácido carboxílico. Otros ácidos grasos que se encuentran comúnmente en los lípidos pueden ser formas saturadas o monoinsaturadas de C_{14} a C_{20} átomos de carbono de longitud (Figura 3.7).

Triglicéridos y lípidos complejos

Los lípidos simples (grasas) contienen ácidos grasos unidos al alcohol *glicerol*, de tres átomos de carbono C_3 (Figura 3.7). Los lípidos simples también se denominan **triglicéridos** porque a la molécula de glicerol se unen tres moléculas de ácidos grasos.

Los lípidos complejos son lípidos simples que contienen elementos adicionales como fósforo, nitrógeno o azufre, o pequeños compuestos hidrofílicos carbonados, como

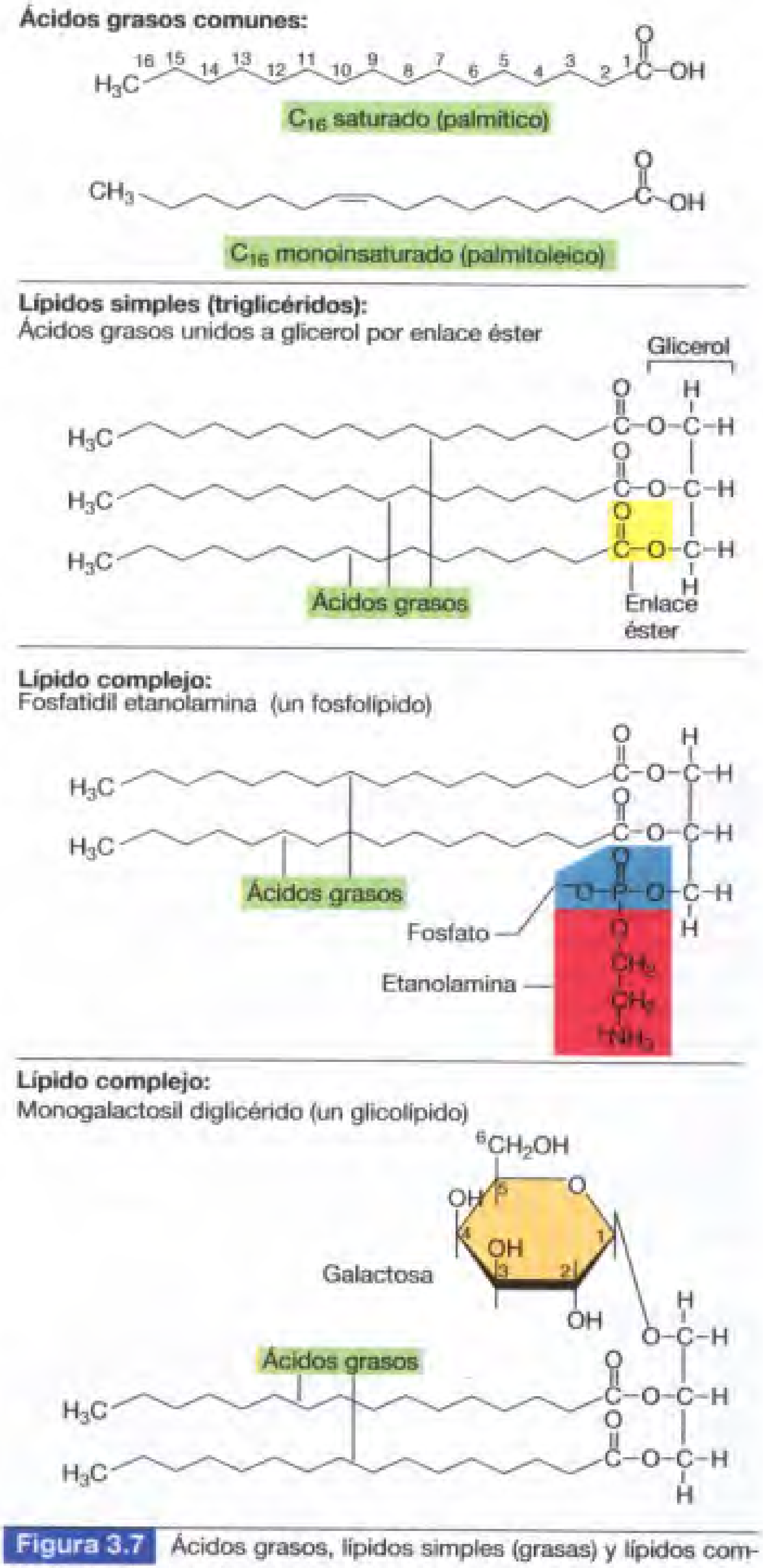

Ácidos grasos comunes:
16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1
H₃C
O
C–OH
C₁₆ saturado (palmítico)
CH₃
O
C–OH
C₁₆ monoinsaturado (palmitoleico)
Lípidos simples (triglicéridos):
Ácidos grasos unidos a glicerol por enlace éster
Glicerol
H₃C
H₃C
H₃C
O
C–O–C–H
H
Ácidos grasos
Enlace éster
Lípido complejo:
Fosfatidil etanolamina (un fosfolípido)
H₃C
H₃C
O–P–O
Ácidos grasos
Fosfato
Etanolamina
CH₂
CH₂
⁺NH₃
Lípido complejo:
Monogalactosil diglicérido (un glicolípido)
⁶CH₂OH
OH
5
O
4
OH
1
3
2
Galactosa
OH
Ácidos grasos
O–C–H
H₃C
H₃C

Figura 3.7 Ácidos grasos, lípidos simples (grasas) y lípidos complejos. Los lípidos simples se forman por una reacción de deshidratación entre los ácidos grasos y el glicerol mediante enlace éster.

---

* Los ácidos grasos pueden existir tanto en forma protonada (RCOOH) como en forma no protonada ($RCOO^-$) dependiendo del pH. Dado que a pH 7 los ácidos grasos suelen estar no protonados, esto se indica añadiendo el sufijo *-ato* a la raíz del término ácido graso. Así, el ácido palmítico es $C_{15}H_{31}COOH$ y el palmitato es $C_{15}H_{31}COO^-$.

azúcares, etanolamina, serina, o colina (Figura 3.7). Los lípidos que contienen un grupo fosfato se llaman **fosfolípidos** y son un grupo importante de lípidos complejos porque desempeñan una importante función estructural en la membrana citoplasmática (*véase* Sección 4.5).

Las propiedades químicas de los lípidos los hacen ideales como componentes estructurales de las membranas. Debido a que son *anfipáticos*, es decir, muestran propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas, se agregan en las membranas con las porciones hidrofílicas orientadas al medio externo o al medio interno citoplasmático, manteniendo sus porciones hidrofóbicas sin contacto con el medio acuoso (*véase* Sección 4.5). Tales estructuras son barreras de permeabilidad adecuadas debido a la incapacidad de las sustancias solubles en agua para atravesar la porción hidrofóbica de los ácidos grasos de los lípidos. Por supuesto, la función fundamental de la membrana citoplasmática es precisamente la de servir de barrera a la libre difusión de sustancias dentro o fuera de las células.

✓ 3.4 Revisión de conceptos

Los lípidos contienen componentes hidrofóbicos e hidrofílicos y sus propiedades químicas son ideales para que cumplan funciones estructurales en las membranas celulares.

- ✓ ¿Qué parte de una molécula de ácido graso es hidrofóbica y cuál hidrofílica?
- ✓ ¿En qué se diferencia un *triglicérido* de un *fosfolípido*?
- ✓ Dibuje la estructura química del butirato, un ácido graso de cuatro átomos de carbono C_4 completamente saturado.

3.5 Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos, DNA y RNA, son macromoléculas formadas por monómeros llamados **nucleótidos**. Por consiguiente, tanto el DNA como el RNA son **polinucleótidos**. El DNA lleva la información genética de la célula y el RNA actúa como una molécula intermediaria para convertir esa información en secuencias definidas de aminoácidos que forman las proteínas. Un nucleótido se compone de tres unidades: un azúcar de 5 átomos de carbono, la ribosa (en el RNA) y la desoxiribosa (en el DNA), una base nitrogenada y una molécula de fosfato, PO_4^{3-}. La Figura 3.8 muestra la estructura general de los nucleótidos del DNA y RNA.

Nucleótidos

Las bases nitrogenadas presentes en los ácidos nucleicos pertenecen a dos clases. Las bases *púricas*, **adenina** y **guanina**, contienen dos anillos heterocíclicos (que contienen más de un tipo de átomo) fusionados, mientras que las bases *pirimidínicas*, **timina**, **citosina** y **uracilo**, contienen un único anillo heterocíclico de seis elementos (que tiene más de una clase de átomos) (Figura 3.9). Mientras que la guanina, adenina y citosina se encuentran tanto en el DNA como en el RNA, la timina se presenta (salvo raras excepciones) sólo en el DNA y el uracilo sólo en el RNA. En un nucleótido, una base se une a una pentosa por enlace glicosídico entre el átomo de carbono 1 del azúcar y un átomo de nitrógeno de la base, bien el átomo de nitrógeno marcado como 1 (en las bases pirimidínicas) o el 9 (en las bases púricas). Una base unida al azúcar, sin el fosfato, se denomina **nucleósido**. Por tanto, los nucleótidos son nucleósidos que contienen uno o más grupos fosfato (Figura 3.10).

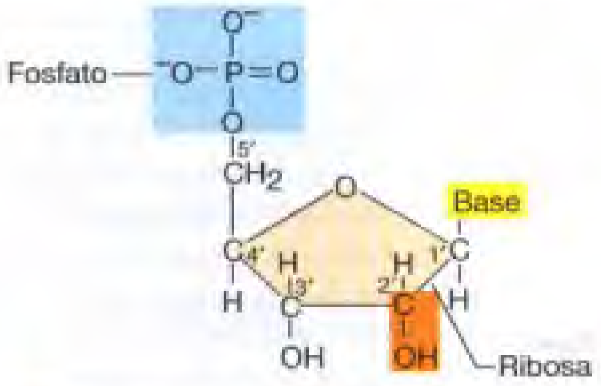


Figura 3.8 Nucleótidos. Se muestra un *ribo*nucleótido, en el RNA. Los *desoxirribo*nucleótidos, en el DNA, tienen un átomo de H en lugar de un grupo OH en el carbono 2′. Los números en los carbonos del azúcar se designan como «prima» (′) porque los átomos en la estructura del anillo de la base nitrogenada también se numeran (1, 2, 3, etc.) (*véase* Figura 3.9). Tanto los desoxirribonucleótidos como los ribonucleótidos contienen un fosfato en la posición 5′.

Los nucleótidos, además de ser los constituyentes de los ácidos nucleicos, desempeñan otras funciones en la célula. Los nucleótidos, en especial el trifosfato de adenosina (ATP)

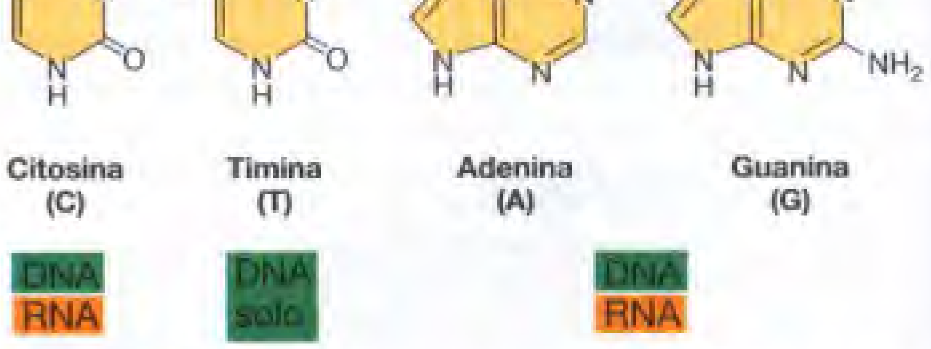


Figura 3.9 Estructura de las bases del DNA y RNA. No se indica el uracilo (U), pero su estructura es la misma que la de la timina, excepto que carece del grupo metilo en el carbono 5. Obsérvese el sistema de numeración de los anillos. Para establecer la unión de la base al carbono 1′ del azúcar-fosfato mostrado en la Figura 3.8, las bases pirimidínicas lo hacen a través del N-1 del anillo y las bases púricas mediante el N-9 del anillo.

(Figura 3.10), actúan como fuentes de energía química liberando, mediante la rotura de un enlace fosfato, suficiente energía como para sumunistrar la requerida para la puesta en marcha de las reacciones celulares (*véase* Sección 5.8). Otros nucleótidos, o derivados de ellos, funcionan en reacciones de oxidación-reducción de las células como transportadores de azúcares en la biosíntesis de los polisacáridos (*véase* Sección 5.7) y como moléculas reguladoras que inhiben o estimulan las actividades de ciertas enzimas o procesos metabólicos. Sin embargo, aquí consideraremos la función de los nucleótidos como elementos estructurales de los ácidos nucleicos, la principal función de *información*.

Ácidos nucleicos

El esqueleto de un ácido nucleico es un polímero en el que alternan moléculas de azúcar y de fosfato (Figura 3.11).

Los polinucleótidos contienen nucleótidos que están unidos covalentemente por medio de fosfato entre el carbono —conocido como carbono 3' (3 prima)— de un azúcar y el carbono 5 (5') de otro azúcar adyacente (Figura 3.11*a*). Desde el punto de vista químico esta unión es un enlace **fosfodiéster** ya que un mismo fosfato se une por enlace éster a dos azúcares separados.

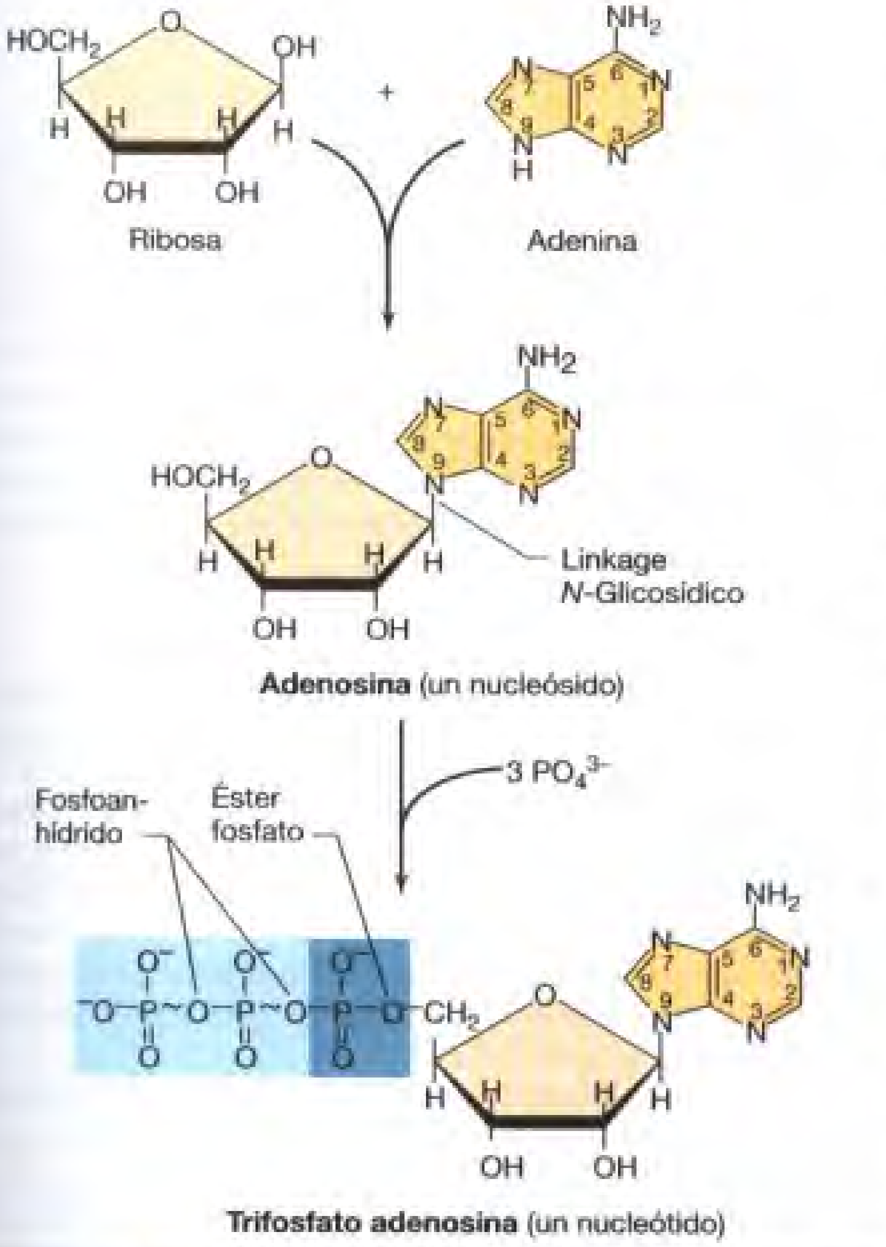


Figura 3.10 Componentes de un importante nucleótido, el trifosfato de adenosina. La energía de hidrólisis de un enlace fosfoanhídrido (indicado con ~) es mayor que la de un éster fosfato y su importancia se verá en el Capítulo 5 (véase Sección 5.8).

La secuencia de nucleótidos en una molécula de DNA o de RNA se denomina su *estructura primaria*. Como hemos dicho, la secuencia de bases en un DNA o en un RNA *lleva la información*, ya que representa la información genética necesaria para reproducir una copia idéntica del organismo. Más adelante veremos que la replicación del DNA y la producción de RNA son procesos muy complejos (*véase* Capítulo 7) y que se necesita un mecanismo prácticamente a salvo de errores para asegurar la fidelidad de la copia en la transferencia de caracteres genéticos de una generación a otra.

DNA

En las células, el DNA celular se presenta en forma de doble cadena. Cada cromosoma contiene dos cadenas de DNA, cada una de las cuales está formada por varios millones de nucleótidos unidos por enlace fosfodiéster. Las cadenas se asocian entre sí mediante puentes de hidrógeno que se forman entre los nucleótidos de una y otra cadena. Cuando las bases púricas y pirimidínicas se sitúan adyacentes unas a otras pueden establecer puentes de hidrógeno (*véase* Figura 3.2*c*). Los enlaces más estables de este tipo ocurren cuando la guanina (G) forma puentes de hidrógeno con la citosina (C), y cuando la adenina (A) los forma con la timina (T) (*véase* Figura 3.2*c*). El apareamiento específico de A con T y de G con C significa que las dos cadenas de DNA son *complementarias* en su secuencia de bases; es decir, que cuando en una cadena aparece G, en la otra aparece C, y si se encuentra T, se encuentra A en su complementaria (Figura 3.11*b*).

RNA

Con pocas excepciones, todos los ácidos ribonucleicos son moléculas de *una sola* cadena. No obstante, las moléculas de RNA se pliegan normalmente sobre sí mismas en las zonas donde se puede producir apareamiento por complementaridad de bases y forman, por tanto, estructuras plegadas. Estos modelos de plegamiento observados en el RNA se conocen como su *estructura secundaria* (Figura 3.11*c*).

El RNA tiene tres funciones importantes en la célula. Por un lado, el **RNA mensajero** (RNAm) contiene la información genética del DNA en una molécula monocatenaria que es *complementaria* en secuencia de bases a una porción de la secuencia de bases del DNA. Por otro, el **RNA de transferencia** (RNAt) son moléculas que actúan como «adaptadores» en la síntesis proteica. Estos RNAs de transferencia traducen la información genética del lenguaje de los nucleótidos al lenguaje de los aminoácidos, que son los constituyentes elementales de las proteínas. Finalmente, el **RNA ribosómico** (RNAr), del que existen distintos tipos, son componentes estructurales y catalíticos muy importantes del ribosoma, es decir, del sistema de la célula que sintetiza las proteínas. Estos distintos tipos de moléculas de RNA se analizan con más detalle en los Capítulos 7 y 11.

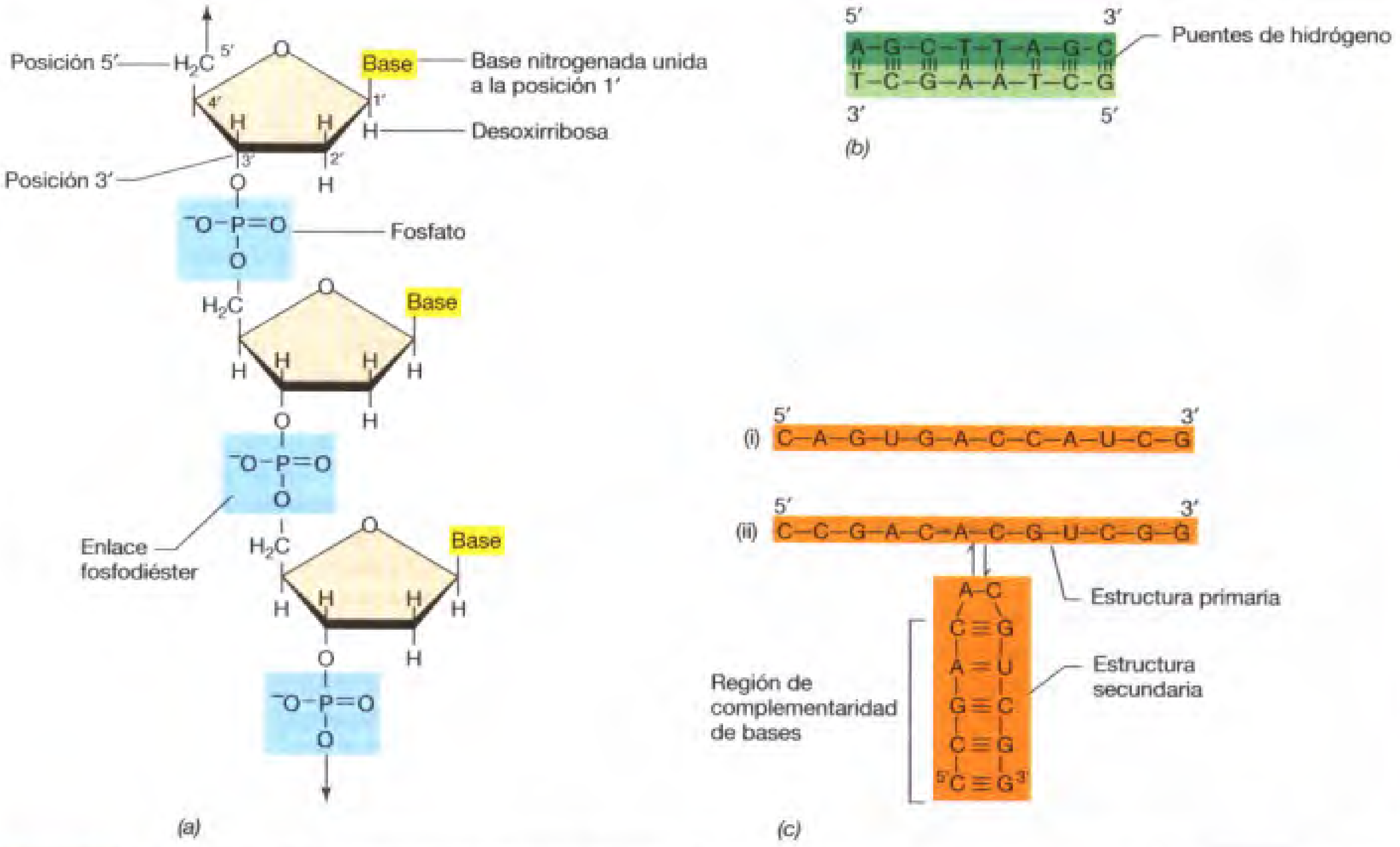


Figura 3.11 DNA y RNA. (a) Estructura parcial de una cadena de DNA. Las bases nitrogenadas pueden ser adenina, guanina, citosina o timina. En el RNA, en el carbono 2′ de la ribosa (*véase* Figura 3.8) se presenta un grupo OH y el uracilo sustituye a la timina. (b) Estructura simplificada del DNA donde sólo se muestran las bases nitrogenadas. Nótese que las dos cadenas son complementarias en su secuencia de bases (A=T; G≡C) y que están unidas por puentes de hidrógeno. Nótese también que las dos cadenas de DNA se muestran en dos tonos diferentes de color verde, una simbología convencional que se mantiene a lo largo de todo este libro. (c) RNA: (i) Secuencia que muestra sólo la estructura primaria; (ii) Secuencia que permite una estructura secundaria. En el RNA, las estructuras secundarias se forman cuando es posible el apareamiento de bases *dentro* de la misma cadena, como se muestra aquí. En algunas moléculas muy largas de RNA, tales como los RNA ribosómicos (*véanse* Secciones 7.15 y 11.4), algunas regiones de la molécula poseen sólo estructura primaria mientras que otras tienen estructura primaria y secundaria. Esto da lugar a estructuras altamente enrolladas y retorcidas (*véase* Figura11.8c) cuya función biológica depende fundamentalmente de su forma tridimensional final. El RNA se muestra siempre en naranja a lo largo de este libro.

✓ 3.5 Revisión de conceptos

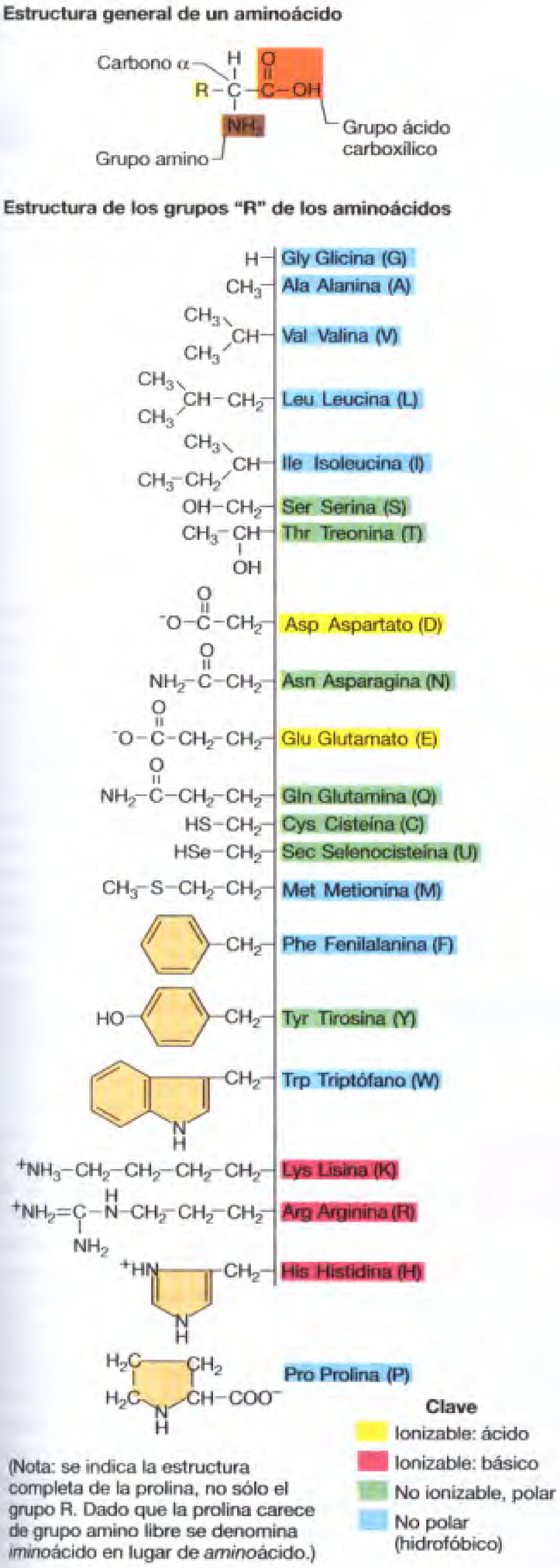
La información contenida en los ácidos nucleicos está determinada por la secuencia de bases nitrogenadas que se encuentra a lo largo de la cadena polinucleotídica. Tanto el DNA como el RNA son macromoléculas portadoras de información. El RNA se puede plegar adoptando configuraciones que constituyen su estructura secundaria.

- ✓ ¿Qué es un *nucleótido*?
- ✓ ¿Qué diferencia un nucleó*sido* de un nucleó*tido*?
- ✓ Diferencie la estructura *primaria* y la estructura *secundaria* de un RNA.

3.6 Aminoácidos y enlace peptídico

Los aminoácidos son las unidades monoméricas de las proteínas. La mayor parte de ellos contienen sólo carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, pero dos de los 21 aminoácidos más comunes en las células contienen también azufre y uno contiene selenio. Todos los aminoácidos contienen dos grupos funcionales, un grupo *carboxílico* (—COOH) y un grupo *amino* (—NH_2) (Tabla 3.1 y Figura 3.12). Estos grupos funcionales son importantes porque permiten formar **enlaces peptídicos**, un tipo de enlace covalente que es característico de las proteínas, que se establecen entre el carbono del grupo carboxilo de un aminoácido y el nitrógeno del grupo amino de otro, con eliminación de una molécula de agua (Figura 3.13).

Todos los aminoácidos tienen la estructura general que se indica en la Figura 3.12. Los aminoácidos difieren entre sí por la naturaleza del grupo lateral (abreviado como R en la Figura 3.12) que está unido al carbono α. El carbono α es el átomo de carbono *inmediatamente adyacente* al grupo carboxílico. Las cadenas laterales varían considerablemente, y pueden ser tan simples como un átomo de hidrógeno en el aminoácido glicina o ser estructuras con anillos aromáticos como en el aminoácido fenilalanina (Figura 3.12). Las


Estructura general de un aminoácido
Carbono α
H
O
R
C
C
OH
NH2
Grupo amino
Grupo ácido carboxílico
Estructura de los grupos "R" de los aminoácidos
H– Gly Glicina (G)
CH3– Ala Alanina (A)
CH3 CH CH3 – Val Valina (V)
CH3 CH–CH2 CH3 – Leu Leucina (L)
CH3 CH CH3–CH2 – Ile Isoleucina (I)
OH–CH2– Ser Serina (S)
CH3–CH OH – Thr Treonina (T)
⁻O–C(=O)–CH2– Asp Aspartato (D)
NH2–C(=O)–CH2– Asn Asparagina (N)
⁻O–C(=O)–CH2–CH2– Glu Glutamato (E)
NH2–C(=O)–CH2–CH2– Gln Glutamina (Q)
HS–CH2– Cys Cisteína (C)
HSe–CH2– Sec Selenocisteína (U)
CH3–S–CH2–CH2– Met Metionina (M)
–CH2– Phe Fenilalanina (F)
HO– –CH2– Tyr Tirosina (Y)
–CH2– N H Trp Triptófano (W)
⁺NH3–CH2–CH2–CH2–CH2– Lys Lisina (K)
⁺NH2=C(NH2)–N(H)–CH2–CH2–CH2– Arg Arginina (R)
⁺HN –CH2– N H His Histidina (H)
H2C CH2 H2C CH–COO⁻ N H Pro Prolina (P)
Clave
🟨 Ionizable: ácido
🟥 Ionizable: básico
🟩 No ionizable, polar
🟦 No polar (hidrofóbico)

(Nota: se indica la estructura completa de la prolina, no sólo el grupo R. Dado que la prolina carece de grupo amino libre se denomina *imino*ácido en lugar de *amino*ácido.)

Figura 3.12 Estructura de los 21 aminoácidos más comunes. El código de tres letras para los aminoácidos se presenta a la izquierda de los nombres y el de una letra aparece entre paréntesis a la derecha de los nombres.

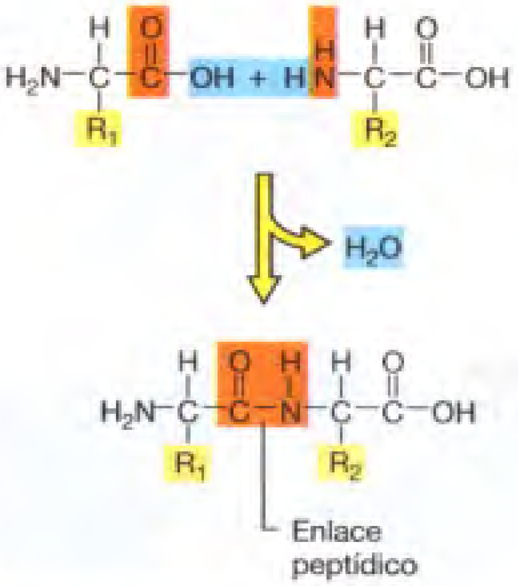

H
O
H2N–C–C–OH + H N–C–C–OH
H
R1
R2
H2O
H2N–C–C–N–C–C–OH
R1
R2
Enlace peptídico

Figura 3.13 Formación del enlace peptídico. R_1 y R_2 indican la porción variable (cadena lateral) del aminoácido (*véase* Figura 3.12).

propiedades químicas de un aminoácido se deben fundamentalmente a la naturaleza de la cadena lateral y por ello los aminoácidos que muestran propiedades químicas similares se pueden agrupar en «familias» como se indica en la Figura 3.12. Por ejemplo, la cadena lateral puede contener en sí misma un grupo carboxílico, como en el caso del ácido aspártico o del ácido glutámico, constituyendo los aminoácidos ácidos. En cambio, varios aminoácidos contienen cadenas laterales hidrofóbicas y representan en conjunto los aminoácidos no polares o apolares. El aminoácido cisteína contiene un grupo sulfhidrilo (—SH) que puede unir una cadena de aminoácidos con otra por un *puente disulfuro* (R—S—S—R). La diversidad química de los aminoácidos permite a las células producir un número enorme de proteínas químicamente distintas, con una diversidad de propiedades bioquímicas muy amplia.

Isómeros

Dos moléculas pueden tener la misma fórmula pero presentar diferentes formas estructurales. Estas moléculas relacionadas pero no idénticas se designan como **isómeros**. Louis Pasteur, el famoso microbiólogo que abolió la teoría de la generación espontánea (*véase* Sección 1.5), comenzó su trayectoria científica como químico estudiando una clase de isómeros llamados *isómeros ópticos*. La asimetría que Pasteur descubrió inicialmente en las formas cristalinas del ácido tartárico (Figura 3.14) constituyó la base de su posterior trabajo en el que puso de manifiesto que los organismos vivos pueden producir también moléculas ópticamente activas (como los aminoácidos y los azúcares).

Muchos isómeros de azúcares comunes forman parte de las paredes celulares de *Bacteria* y *Archaea* (*véase* Sección 4.8). Los isómeros que presentan las mismas fórmulas moleculares y estructurales, pero que difieren en que uno es la «imagen especular» del otro, como la mano derecha re-

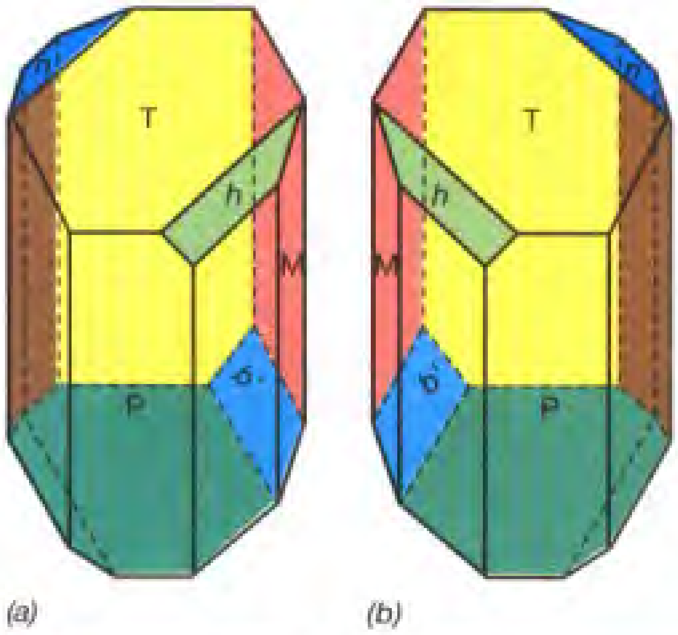


Figura 3.14 Esquemas realizados por Louis Pasteur de los cristales del ácido tartárico ($C_4H_6O_6$), usados para ilustrar su famosa publicación sobre la actividad óptica de los isómeros. (a) Cristal levógiro (forma L). (b) Cristal dextrógiro (forma D). Nótese que los dos cristales corresponden a imágenes especulares (es decir, son enantiómeros o estereoisómeros). Las letras en las caras del cristal fueron utilizadas por Pasteur para indicar las caras que corresponden a la imagen especular de los dos cristales. Se ha añadido color para facilitar la visualización de las diferentes caras.

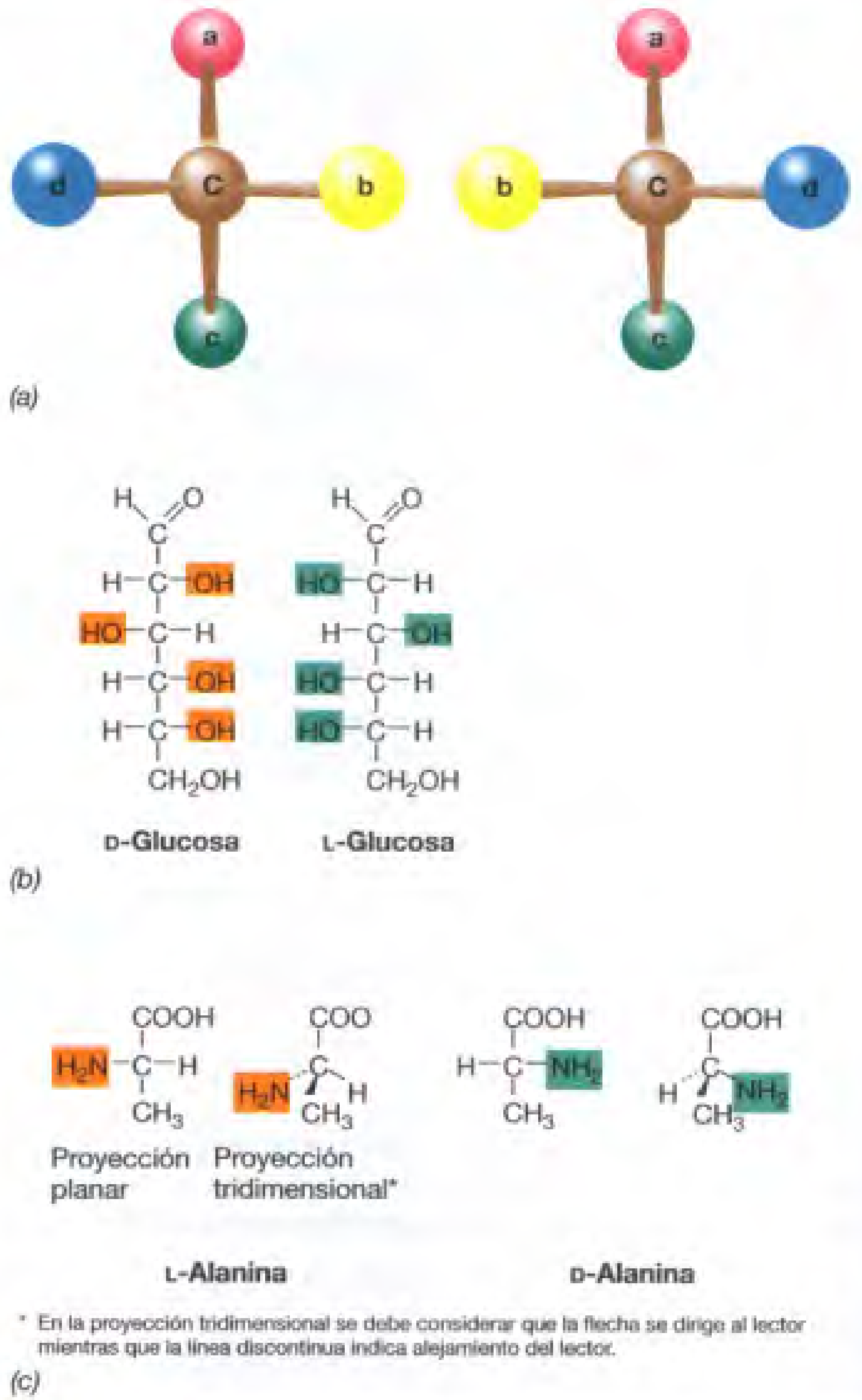
fleja a la izquierda, se llaman **enantiómeros** y se designan como D y L (Figura 3.15*b*). Los azúcares con configuración D son los que predominan en los sistemas biológicos.

Como los azúcares, los aminoácidos pueden existir también como enantiómeros D o L. Sin embargo, en el caso de las proteínas la vida ha evolucionado usando las formas L de los aminoácidos en vez de las formas D (Figura 3.15*c*). No obstante se encuentran esporádicamente aminoácidos D en la naturaleza, más frecuentemente en el polímero del peptidoglicano de la pared celular (*véase* Sección 4.8) y en algunos antibióticos polipeptídicos (*véase* Sección 20.9). Los procariotas presentan la capacidad de convertir aminoácidos D en aminoácidos L, y azúcares en configuración L a la forma D, mediante enzimas que catalizan específicamente esta transformación. Estas células contienen las enzimas llamadas **racemasas**, cuya función es convertir la forma poco habitual (azúcares en configuración L o aminoácidos en configuración D) a la forma metabolizable (azúcar D o aminoácido L).

✓ 3.6 Revisión de conceptos

En las células se encuentran los 21 aminoácidos habituales que se pueden unir entre sí mediante *enlace peptídico*. Existen formas de azúcares y aminoácidos que son imágenes especulares (enantiómeros), pero sólo un isómero óptico de cada tipo se encuentra en los polisacáridos y las proteínas de la célula, respectivamente.

- ✓ ¿Por qué podemos decir que los aminoácidos son al mismo tiempo similares y diferentes?
- ✓ Dibuje la estructura de un dipéptido formado por los aminoácidos alanina y tirosina y señale el enlace peptídico.
- ✓ ¿Qué formas enantiómeros de azúcares y aminoácidos se encuentran habitualmente en los organismos vivos? ¿Por qué el aminoácido *glicina* no tiene diferentes enantiómeros?



* En la proyección tridimensional se debe considerar que la flecha se dirige al lector mientras que la línea discontinua indica alejamiento del lector.

Figura 3.15 Isómeros. (a) Modelo espacial de bolas y varillas mostrando imágenes especulares. (b) Estereoisómeros de glucosa. (c) Estereoisómeros del aminoácido alanina.

3.7 Proteínas: estructuras primaria y secundaria

Las proteínas llevan a cabo funciones celulares esenciales. Existen fundamentalmente dos clases de proteínas, las proteínas *catalíticas* (enzimas) y las proteínas *estructurales*. Las enzimas son los catalizadores de una amplia variedad de reacciones químicas que tienen lugar dentro de las células (*véanse* Capítulos 5 y 17). Por el contrario, las proteínas estructurales son aquellas que son partes integrales de las estructuras de las células en membranas, paredes celulares y componentes citoplasmáticos. Esencialmente, una célula depende del tipo y cantidad de proteínas que contiene. Por tanto, el conocimiento de la estructura de las proteínas es esencial para comprender el funcionamiento de la célula.

Estructura primaria

Las proteínas son polímeros de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos (Figura 3.13). Dos aminoácidos unidos forman un *dipéptido,* tres aminoácidos un *tripéptido,* y así sucesivamente. Cuando muchos aminoácidos se unen por enlaces peptídicos forman un **polipéptido,** y las proteínas están formadas por uno o varios polipéptidos. El número de aminoácidos presentes en una proteína varía de una a otra. Hay proteínas que contienen tan sólo 15 mientras que otras llegan a tener hasta 10 000 aminoácidos. Como las proteínas varían en cuanto a composición, secuencia y número de aminoácidos, es fácil darse cuenta de que existe una gran variabilidad en la estructura (y función) de las proteínas.

La disposición lineal de los aminoácidos en un polipéptido constituye su *estructura primaria.* La estructura primaria de un polipéptido es muy importante porque cada estructura primaria es compatible sólo con determinados tipos de plegamiento. La forma final plegada del polipéptido es la que tiene actividad biológica. Por ello, se puede considerar que la estructura primaria de un polipéptido es la que determina en mayor medida sus propiedades biológicas.

Estructura secundaria

La disposición de las cadenas laterales R de los distintos aminoácidos en un polipéptido hace que la molécula se disponga y se pliegue de un modo específico. Esto conduce a la formación de la **estructura secundaria** de la proteína (Figura 3.16). Los puentes de hidrógeno y las uniones no covalentes débiles explicadas anteriormente (*véase* Sección 3.1) son importantes para establecer el tipo de estructura secundaria que adopta una proteína. Uno de estos tipos de estructura es la *hélice α.* Para imaginar una hélice proteica, consideremos un péptido lineal enrollado a un cilindro (Figura 3.16*a*). En esas condiciones, los átomos de oxígeno y de nitrógeno de los diferentes aminoácidos tienden a disponerse en la estructura enrollada lo suficientemente próximos como para permitir el establecimiento de puentes de hidrógeno. La posibilidad de formar puentes de hidrógeno (y la estabilidad inherente asociada a su formación) facilita que muchos polipéptidos adopten directamente una estructura secundaria en hélice α (Figura 3.16*a*).

Otros polipéptidos adoptan una estructura secundaria diferente llamada *hoja β.* En la hoja *β,* la cadena de aminoácidos del polipéptido se pliega en zig-zag sobre sí misma en vez de formar una hélice; este tipo de plegamiento deja al descubierto átomos de hidrógeno que pueden establecer puentes de hidrógeno (Figura 3.16*b*).

La estructura secundaria de muchos polipéptidos contiene tanto regiones en hélice α como regiones en hoja β; y el tipo de plegamiento concreto viene determinado en cada caso por las oportunidades que tenga de formar puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. La estructura secundaria de tipo hoja β confiere una estructura más bien rígida, mientras que la estructura en hélice α es normalmente más flexible, por lo que la estructura secundaria de un polipéptido condiciona, en gran medida, la función de una determinada proteína en la célula. Muchos polipéptidos se pliegan en dos o más segmentos, cada uno de los cuales presenta una estructura secundaria diferente (*véase*

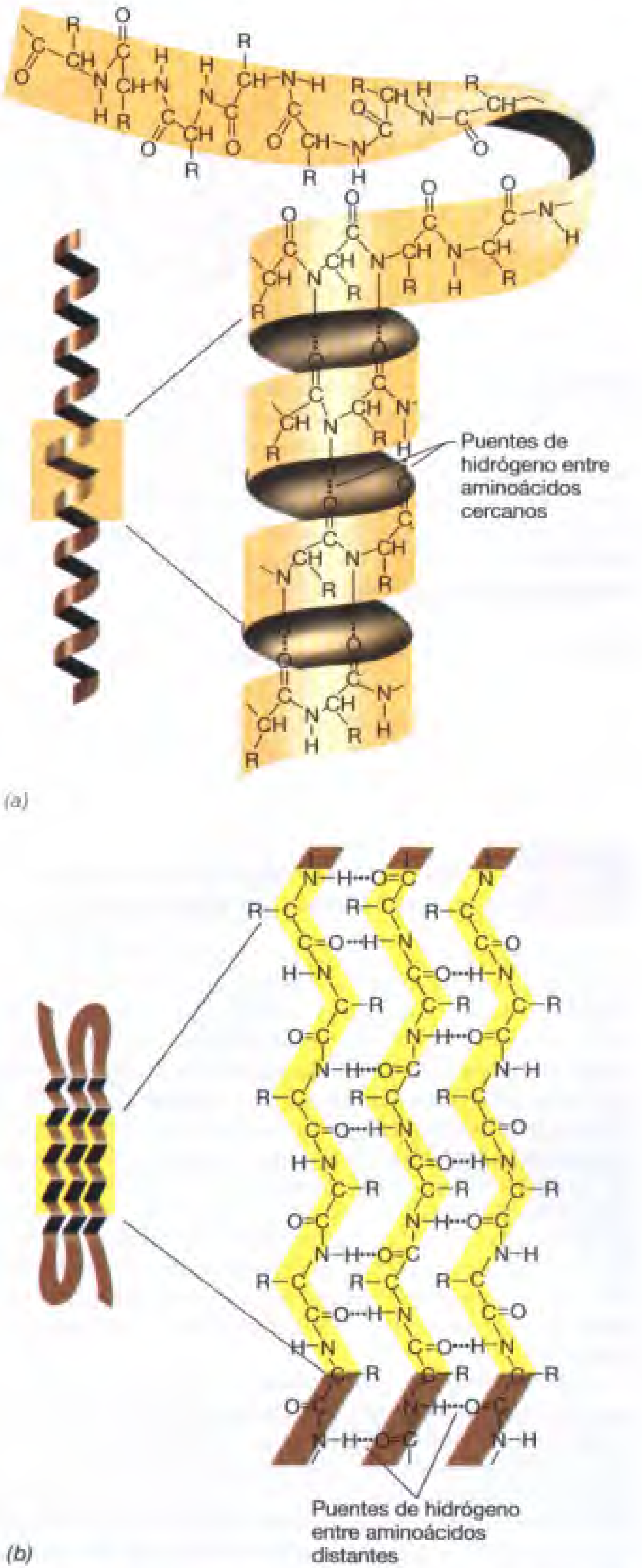
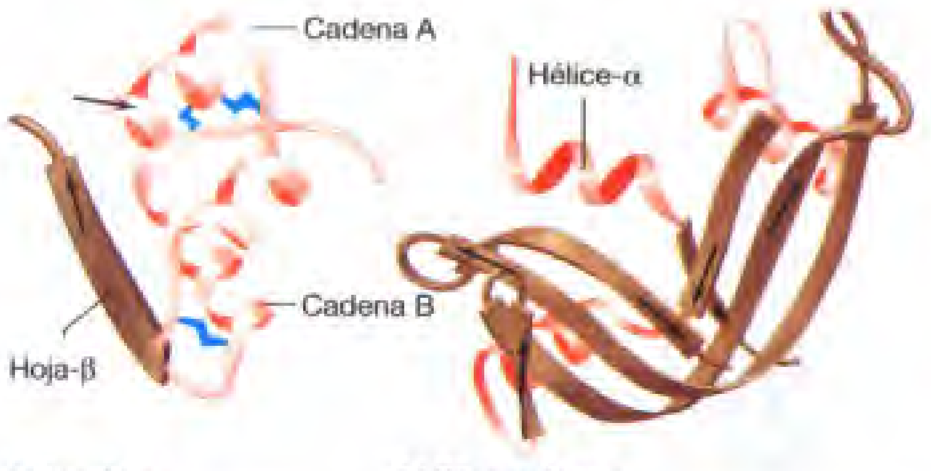

Puentes de hidrógeno entre aminoácidos cercanos
(a)
Puentes de hidrógeno entre aminoácidos distantes
(b)

Figura 3.16 Estructura secundaria de polipéptidos. (a) Estructura secundaria en hélice-α. Nótese que los puentes de hidrógeno no afectan a los grupos R, sino que implican a los átomos que participan en los enlaces peptídicos. (b) Estructura secundaria en hoja-β.



(a) Insulina *(b)* Ribonucleasa

Figura 3.17 Estructura terciaria de polipéptidos mostrando posiciones donde pueden localizarse regiones de hélice-α y hoja-β. (a) Insulina, una proteína que contiene dos cadenas polipeptídicas; obsérvese cómo la cadena B contiene estructura secundaria tanto en hélice-α como en hoja-β y cómo los puentes disulfuro (señalados en azul) pueden determinar las disposiciones del plegamiento (estructura terciaria). (b) Ribonucleasa, una proteína grande con varias regiones dispuestas en hélice-α y otras en hoja-β.

Figura 3.17). Estos segmentos, denominados *dominios*, son regiones del polipéptido que tienen funciones específicas en la molécula proteica final.

3.8 Proteínas: estructuras de orden superior y desnaturalización

Una vez que un polipéptido ha adoptado una estructura secundaria determinada, se pliega sobre sí mismo para formar una molécula aún más estable. Esa disposición conduce a la formación de la **estructura terciaria** de las proteínas. Como ocurre con la estructura secundaria, la estructura terciaria de una proteína está determinada en definitiva por la estructura primaria, pero también está regida por la estructura secundaria de la molécula. A consecuencia de la formación de la estructura secundaria, la cadena lateral de cada aminoácido del polipéptido queda en una posición específica. Si se pueden formar enlaces adicionales de hidrógeno, uniones covalentes, interacciones hidrofóbicas u otras interacciones atómicas, el polipéptido se plegará hasta alcanzar una forma tridimensional única (Figura 3.17).

Con frecuencia un polipéptido se dobla de tal forma que quedan expuestos grupos sulfhidrilo (-SH) pertenecientes a residuos de cisteína. Estos grupos -SH libres se pueden unir covalentemente formando un puente disulfuro (-S-S-) entre los dos aminoácidos. Si los dos residuos de cisteína pertenecen a diferentes cadenas polipeptídicas de una proteína, el puente disulfuro une físicamente las dos moléculas (Figura 3.17*a*). Además, un único polipéptido se puede plegar y unirse a sí mismo si dos residuos de cisteína originan un puente disulfuro dentro de la misma molécula. La disposición terciaria del polipéptido origina finalmente en la molécula regiones expuestas y otras hendidas (Figura 3.17 y 3.18), que pueden ser importantes en la unión con otras moléculas (por ejemplo, en la unión entre un sustrato y una enzima) (*véase* Sección 5.5).

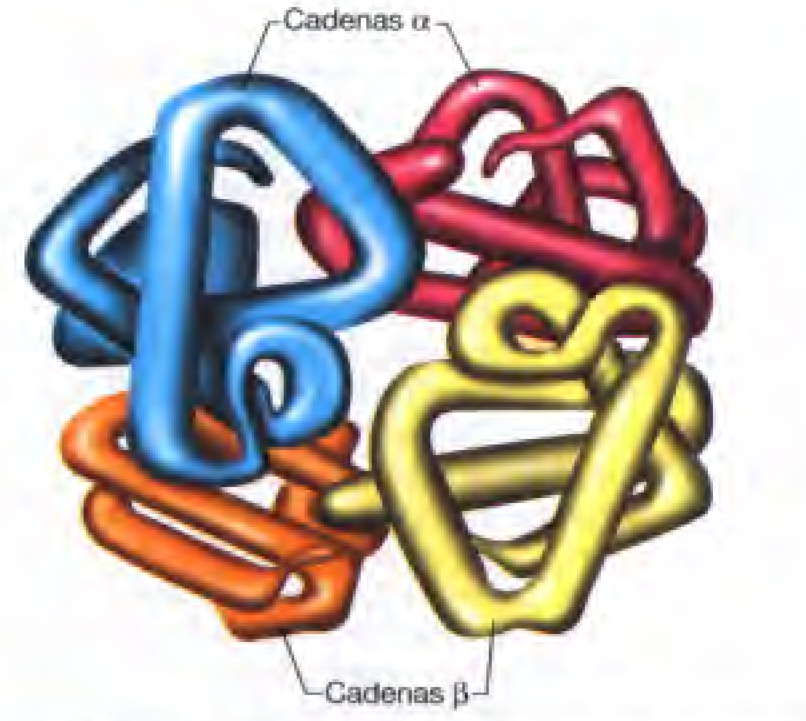


Figura 3.18 Estructura cuaternaria de la hemoglobina. En esta proteína hay dos *clases* de polipéptidos, las cadenas α (que se muestran en azul y rojo) y las cadenas β (que aparecen en naranja y amarillo), y un total de cuatro polipéptidos en la molécula final. Los distintos colores permiten distinguir las cuatro cadenas.

Si una proteína consta de más de un polipéptido, como es el caso de muchas proteínas, la disposición espacial de las subunidades polipeptídicas, que forma la molécula proteica final, se conoce como **estructura cuaternaria** de la proteína (Figura 3.18). En las proteínas que presentan estructura cuaternaria, cada subunidad de la estructura final tiene su propia estructura primaria, secundaria y terciaria. Algunas proteínas con estructura cuaternaria contienen varias subunidades idénticas; otras contienen subunidades distintas, y algunas pueden contener más de una subunidad idéntica y un segundo tipo de subunidad distinta. Las subunidades de las proteínas multiméricas se mantienen unidas por interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas) o por enlaces covalentes, que frecuentemente son enlaces disulfuro entre subunidades.

Desnaturalización

Cuando las proteínas se exponen a valores extremos de temperatura o de pH, u otras sustancias que afectan a sus propiedades de plegamiento, se dice que sufren **desnaturalización** (Figura 3.19). En general, las propiedades biológicas de una proteína se pierden cuando se desnaturaliza. Sin embargo, los enlaces peptídicos (Figura 3.13) no resultan alterados. La desnaturalización provoca un desplegamiento de la cadena polipeptídica al destruirse la estructura de orden superior de la molécula. El polipéptido desnaturalizado retiene su estructura primaria porque está mantenida por enlaces peptídicos covalentes. Dependiendo de las condiciones de desnaturalización, el polipéptido puede volver a plegarse una vez eliminado el agente desnaturalizante (Figura 3.19). No obstante, el hecho de que la desnaturalización conlleve generalmente la pérdida de la actividad biológica de la proteína demuestra claramente que la actividad biológica no puede asociarse directamente a la estructura primaria de las proteínas, sino que es el resultado del plegamiento preciso de las moléculas (condicionado en última instancia por la estructura primaria). Por tanto, el plegamiento de un polipéptido le confiere una forma singular que es compatible con una función biológica *específica*.

La desnaturalización de las proteínas tiene un interés que va mucho más allá de lo estrictamente académico, ya que es uno de los principales procesos por el que los microorganismos pueden ser destruídos. Veremos en el Capítulo 20 cómo varios compuestos químicos destruyen microorganismos mediante la desnaturalización de las proteínas. Por ejemplo, los alcoholes como el fenol y el etanol son desinfectantes eficaces porque penetran rápidamente en las células y desnaturalizan irreversiblemente sus proteínas. Dichos agentes químicos son extremadamente útiles para la desinfección de objetos inanimados (fomites), por ejemplo las superficies; y tienen un valor práctico enorme en la desinfección de casas, hospitales e industrias.

El camino por recorrer

Ahora que tenemos un conocimiento más sólido de la química de la vida, pasaremos al Capítulo 4, que trata de las relaciones estructurales de las células. En este capítulo veremos cómo las distintas macromoléculas aquí revisadas forman las principales estructuras de la célula, tales como la membrana, la pared celular, el flagelo, etc. Después consideraremos las propiedades básicas del metabolismo de las células en el Capítulo 5. Aunque quizá no parezca obvio llegados a este punto, la materia de los Capítulos 4 y 5 guarda una estrecha relación dado que el metabolismo, la maquinaria que hace que funcione una célula (*véase* Sección 1.2), dirige la síntesis y ensamblaje de las macromoléculas en estructuras celulares. Estos procesos culminan en el crecimiento celular (Capítulo 6).

A medida que vayamos avanzando en este libro, es aconsejable volver al Capítulo 3 de vez en cuando para recordar los principios que rigen la química de la vida. Aunque los microorganismos han desarrollado una diversidad casi ilimitada de macromoléculas, esta diversidad se reduce -casi siempre- a variaciones en los motivos estructurales de las cuatro clases de macromoléculas comentadas en este capítulo. Y, como cualquier microbiólogo sabe, la comprensión conceptual de la química y de las propiedades de las proteínas, los lípidos, los ácidos nucleicos y los polisacáridos reporta grandes beneficios en el conocimiento de los principios básicos de la microbiología.

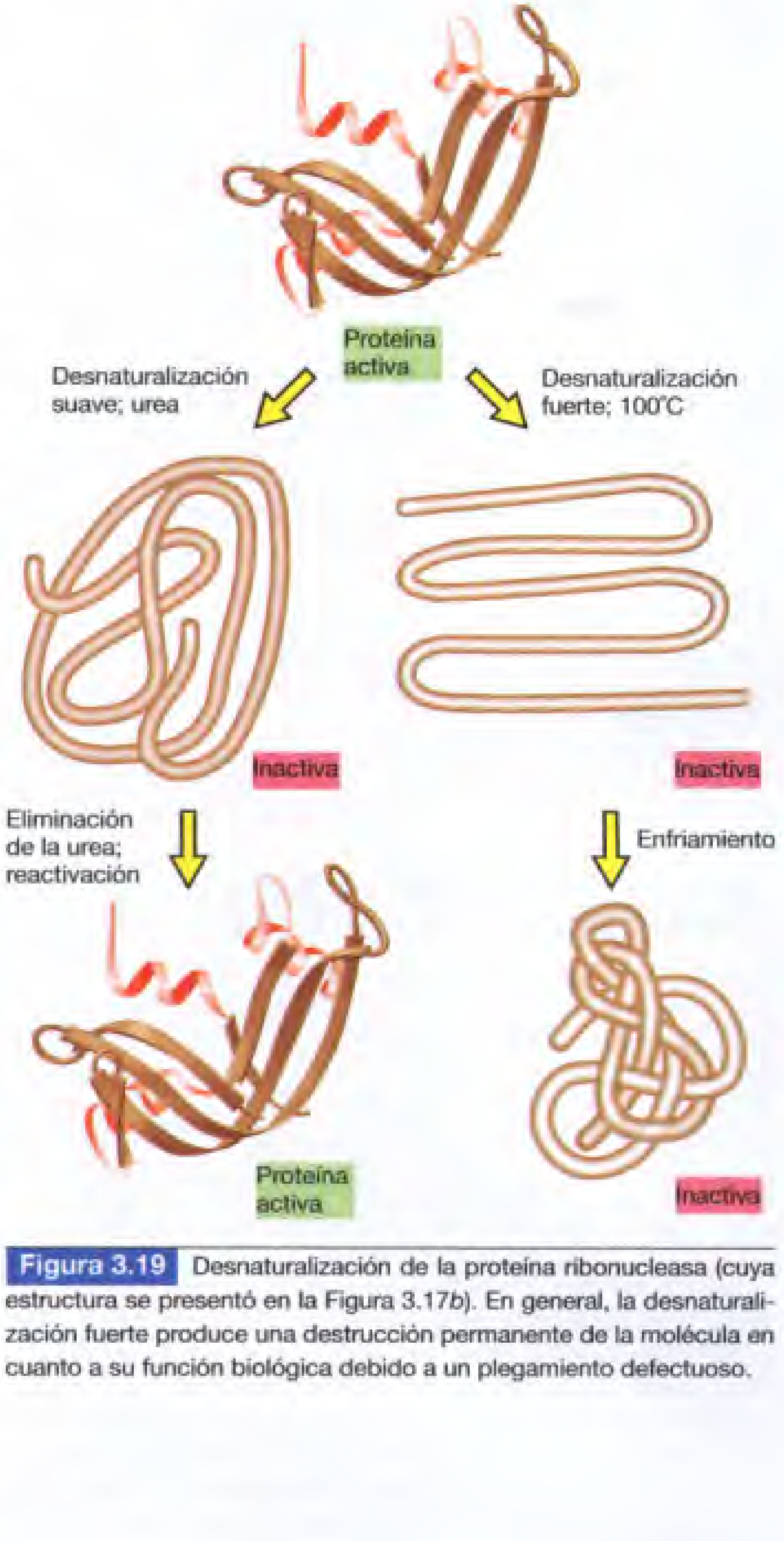

Proteína activa
Desnaturalización suave; urea
Desnaturalización fuerte; 100°C
Inactiva
Inactiva
Eliminación de la urea; reactivación
Enfriamiento
Proteína activa
Inactiva

Figura 3.19 Desnaturalización de la proteína ribonucleasa (cuya estructura se presentó en la Figura 3.17*b*). En general, la desnaturalización fuerte produce una destrucción permanente de la molécula en cuanto a su función biológica debido a un plegamiento defectuoso.

✓ 3.7 y 3.8 Revisión de conceptos

La estructura primaria de una proteína viene determinada por su secuencia de aminoácidos, pero es el plegamiento del polipéptido (en estructuras de orden superior) el que determina cómo funciona una proteína en la célula.

- ✓ Defina los términos estructura *primaria*, *secundaria* y *terciaria* de una proteína.
- ✓ ¿Cuál es la diferencia entre un *polipéptido* y una *proteína*?
- ✓ ¿Qué características hacen que la estructura secundaria de tipo hoja β sea más rígida que la de tipo hélice α?
- ✓ ¿Cuál sería la estructura cuaternaria de una proteína *homodimérica*? ¿Y cuál la de una proteína *heterodimérica*?
- ✓ Describa los efectos estructurales y biológicos de la desnaturalización de una proteína. ¿Cuál es la aplicación *práctica* de la desnaturalización de las proteínas?

Preguntas de repaso

1. ¿Cuáles son los principales elementos que se encuentran en los organismos vivos? ¿Por qué el oxígeno y el hidrógeno son particularmente abundantes en los organismos vivos?
2. Defina la palabra *molécula*. ¿Cuántos átomos hay en una molécula de hidrógeno gaseoso? ¿Y en una molécula de glucosa?
3. Observe la estructura de la base nitrogenada citosina que se indica en la Figura 3.1. Dibuje esta estructura y luego señale las posiciones de todos los enlaces sencillos y dobles en la molécula citosina.
4. Compare y diferencie entre *monómero* y *polímero*. Indique tres ejemplos de polímeros con importancia biológica y designe los monómeros de los que se componen.
5. Señale los componentes que forman un lípido sencillo. ¿En qué difiere un triglicérido de un lípido complejo?
6. Examine la estructura del triglicérido y de la fosfatidil etanolamina que se indican en la Figura 3.7. Comente cómo la sustitución del fosfato y de la etanolamina podría alterar las propiedades químicas del lípido.
7. El DNA y el RNA son macromoléculas similares pero también muestran diferencias. Indique tres diferencias químicas o físicas entre ellos. ¿Cuáles son las funciones celulares del DNA y del RNA?
8. ¿Por qué los *aminoácidos* reciben ese nombre? Escriba la estructura general de un aminoácido. ¿Por qué es importante la naturaleza del grupo R en la estructura final de la proteína? ¿Por qué el aminoácido *cisteína* es particularmente importante para la estructura de una proteína?
9. ¿Qué tipo de reacción química conduce a la formación de un enlace peptídico entre dos aminoácidos? (Puede consultar la Figura 3.13 antes de responder.)
10. Dibuje el enlace peptídico. A continuación vuelva a dibujar dicha estructura en forma atómica (*véase* Figura 3.1) mostrando la disposición de los electrones en los átomos que participan en el enlace peptídico.

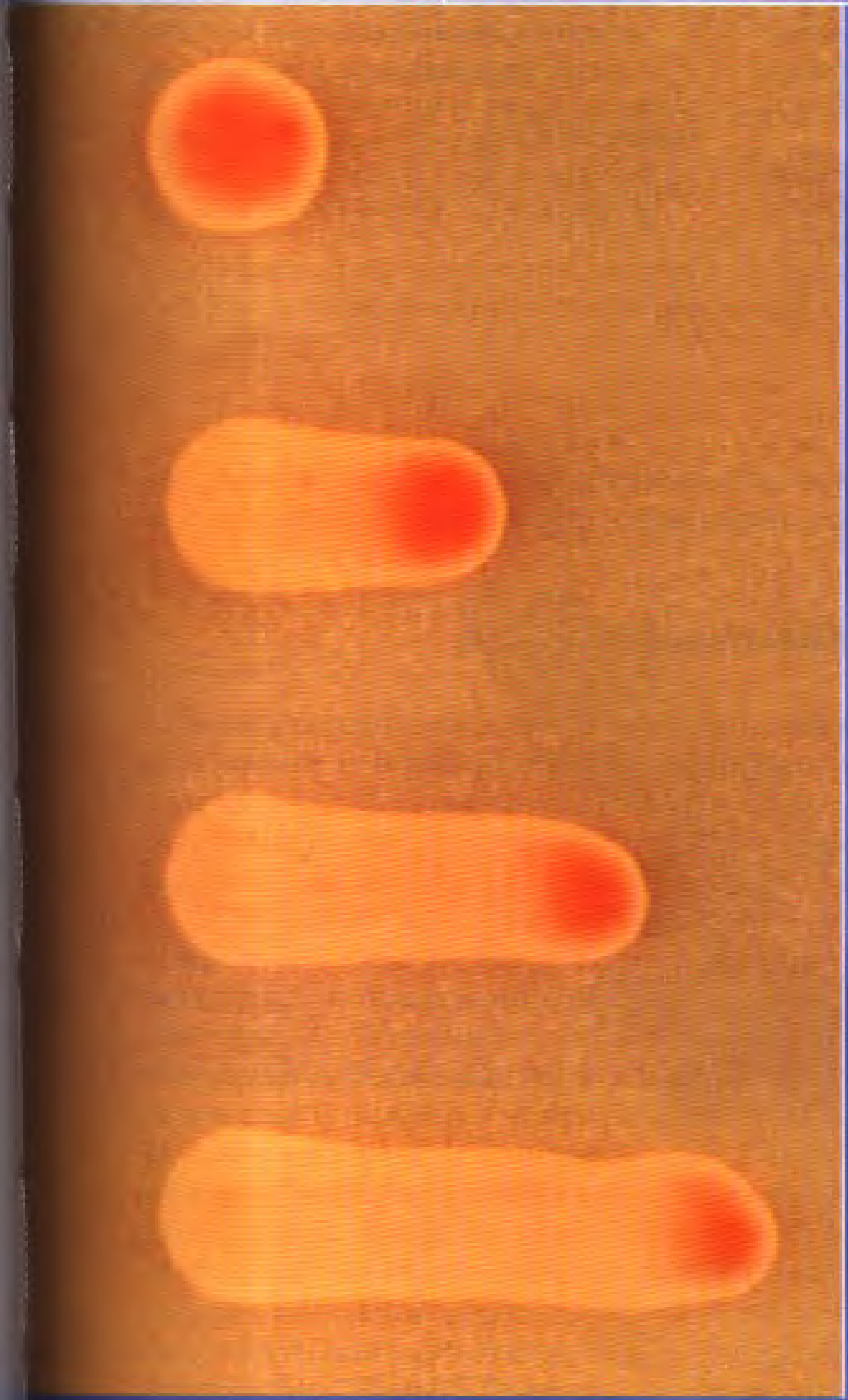
Ejercicios prácticos

1. Observe las siguientes secuencias nucleotídicas en un RNA: (a) GUCAAAGAC, (b) ACGAUAACC. ¿Puede tener estructura secundaria cada una de estas moléculas? Si la respuesta es afirmativa, dibuje la(s) posible(s) estructura(s) secundaria (s) del RNA.
2. Unas cuantas proteínas citoplasmáticas solubles tienen un elevado contenido de aminoácidos hidrófobos. ¿Cómo se plegarán estas proteínas en cuanto a su estructura terciaria y por qué?
3. Las células del género *Halobacterium*, una arquea que vive en ambientes muy salinos, contienen más de 5 molar (M) de potasio (K^+). Debido a este elevado contenido en K^+, muchas proteínas citoplasmáticas de *Halobacterium* están enriquecidas en dos aminoácidos específicos que están presentes en esta bacteria, en mucha mayor proporción que en proteínas con función similar en *Eschericha coli* (que tiene niveles muy bajos de K^+ en su citoplasma). ¿En qué aminoácidos están enriquecidas las proteínas de *Halobacterium* y por qué? *Pista indicativa*: ¿qué aminoácidos podrían neutralizar mejor las cargas *positivas* debidas al K^+?
4. A menudo las proteínas que muestran estructura secundaria en hélice α son más flexibles que las que muestran estructura secundaria en hoja β. Comente por qué puede ser ésta la razón.
5. Cuando se hierve un huevo ocurren cambios en él casi inmediatamente. Describa lo que sucede y por qué el contenido de un huevo hervido es tan diferente del de un huevo fresco.
6. Teniendo en cuenta la respuesta anterior, explique por qué ciertos procariotas, llamados *hipertermófilos*, se desarrollan (y crecen en condiciones óptimas) en fuentes termales en ebullición. ¿Cuál puede ser la diferencia entre las proteínas de los hipertermófilos de las del huevo?

Los microorganismos poseen estructuras que les permiten coexistir con otros microorganismos y con organismos superiores. Una de estas estructuras es el flagelo, un sistema de propulsión que proporciona movilidad a la célula. Aquí se muestra una colonia de una bacteria fototrófica muy móvil, *Rhodospirillum centenum*. Este organismo puede detectar la luz (que en este caso incide desde la derecha) y las células móviles desplazan la colonia hacia la luz en un tipo de respuesta llamado *fototaxis*. La fototaxis y otras taxias sirven como ejemplo de respuestas de comportamiento y demuestran claramente que organismos tan «simples» como las bacterias, pueden responder a estímulos de su medio ambiente.

4

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN CELULAR



I MICROSCOPÍA Y MORFOLOGÍA CELULAR 56
4.1 Microscopía óptica 56
4.2 Imagen tridimensional: microscopía de contraste de interferencia, fuerza atómica y confocal 60
4.3 Microscopía electrónica 62
4.4 Morfología celular y la importancia de ser pequeño 63

II MEMBRANAS Y PAREDES CELULARES 66
4.5 Estructura de la membrana citoplasmática 66
4.6 Función de la membrana citoplasmática 69
4.7 Sistemas de transporte de membrana 71
4.8 La pared celular de los procariotas: peptidoglicano y moléculas relacionadas 74
4.9 La membrana externa de las *Bacteria* Gram negativas 79

III MOVIMIENTO MICROBIANO 82
4.10 Flagelos y movilidad 82
4.11 Movilidad por deslizamiento 85
4.12 Respuestas sensoriales: quimiotaxis, fototaxis y otras taxias 87

IV ESTRUCTURAS DE SUPERFICIE E INCLUSIONES EN PROCARIOTAS 90
4.13 Estructuras de la superficie bacteriana e inclusiones celulares 90
4.14 Vesículas de gas 94
4.15 Endosporas 95

Glosario

Endospora una forma de resistencia al calor y otras condiciones ambientales, rodeada por una gruesa pared que se origina por diferenciación en algunas *Bacteria* Gram positivas

Flagelo un apéndice largo y delgado con capacidad de rotación que se presenta en algunos procariotas y es responsable de su propulsión en medios líquidos

Fototaxis movimiento de un organismo hacia la luz

Gram negativa un tipo de célula procariótica cuya pared celular contiene relativamente poco peptidoglicano y presenta una membrana externa compuesta por lipopolisacárido, lipoproteína y otras macromoléculas complejas

Gram positiva tipo de célula procariótica cuya pared celular está compuesta básicamente por peptidoglicano y que carece de membrana externa

Lipopolisacárido (LPS) lípido que contiene polisacárido y proteína y que es el compuesto mayoritario en la pared celular de las *Bacteria* Gram negativas

Magnetosomas partículas de magnetita (Fe_3O_4) que forman una estructura rodeada por una membrana no lípido-proteica (no una unidad de membrana) en las *Bacteria* magnetotácticas

Membrana citoplasmática barrera con permeabilidad selectiva que envuelve al citoplasma y lo separa del entorno

Peptidoglicano una molécula polisacarídica formada por unidades repetitivas y alternantes de acetilglucosamina y ácido acetilmurámico y péptidos cortos que forma capas adyacentes unidas a través de puentes peptídicos

Periplasma región gelatinosa entre la capa externa de la membrana citoplasmática y la superficie interna de la capa de lipopolisacárido de las *Bacteria* Gram negativas

Perítrico modelo de flagelación en el que los flagelos se localizan alrededor de la superficie celular

Poli-β-hidroxibutirato (PBH) material de reserva nutritiva presente en procariotas compuesto por un polímero de β-hidroxibutirato u otro tipo de ácido β-alcanoico

Protoplasto una célula a la que se le ha eliminado la pared celular y sólo es viable en un medio osmótico adecuado

Quimiotaxis movimiento de un organismo hacia (positivo) o alejándose de (negativo) un gradiente de un compuesto químico

Ribosoma pequeñas partículas compuestas de RNA y proteínas que intervienen en la síntesis de proteínas

Translocación de grupo mecanismo de transporte dependiente de energía, en el cual la molécula transportada es modificada químicamente durante el transporte

Transportador ABC un sistema transportador de membrana que comprende tres proteínas, una que hidroliza ATP como fuente de energía permitiendo el transporte, otra que une el sustrato en el exterior de la célula y otra que actúa como canal de transporte a través de la membrana

Vesículas de gas estructuras citoplasmáticas llenas de gas y limitadas por proteínas que permiten la flotabilidad de las células

I MICROSCOPÍA Y MORFOLOGÍA CELULAR

En este capítulo se presentan los principios básicos sobre la estructura y función de los componentes de las células microbianas, en particular de las células procarióticas (*Bacteria* y *Archaea*). En el Capítulo 14 se presentarán con detalle aspectos sobre la estuctura y diversidad de las células eucarióticas. Este capítulo se organiza en cuatro secciones que tratan de la microscopía, las membranas y paredes celulares, el movimiento, y las estructuras de superficie e inclusiones, respectivamente.

Las células, como los edificios, se construyen uniendo de varias formas elementos pequeños hasta crear estructuras más complejas. Los monómeros (como los aminoácidos y los nucleótidos) se emplean para construir macromoléculas (tales como proteínas y ácidos nucleicos); y las macromoléculas forman a su vez estructuras más complejas que tienen funciones definidas, como los ribosomas, las membranas, las paredes celulares, etc. Pese a la gran diversidad *química* de las macromoléculas que forman las diferentes células hay que destacar que todas las células presentan problemas estructurales comunes y que, desde un punto de vista arquitectónico, los resuelven de manera similar.

Comenzamos con una presentación del microscopio. Históricamente el microscopio fue el primero que permitió revelar los secretos de la estructura celular y todavía hoy continúa siendo un instrumento muy valioso en biología celular.

4.1 Microscopía óptica

Para el examen microscópico de los microorganismos se puede utilizar el **microscopio óptico** o el **microscopio electrónico**. En general, el microscopio óptico se usa para observar células intactas, mientras que los microscopios electrónicos se usan para observar estructuras internas o detalles de las superficies celulares.

Todos los microscopios utilizan lentes para aumentar la imagen de una célula de modo que se puedan observar sus detalles estructurales. Además del aumento, es importante la *resolución*, propiedad que permite observar dos puntos adyacentes como puntos separados. Aunque el aumento se puede incrementar prácticamente sin límite, no ocurre lo mismo con la resolución, que está limitada por las propiedades físicas de la luz. Por tanto, es la resolución y no el aumento lo que en último término marca los límites de lo que podemos ver en un microscopio. Iniciamos esta presentación con el microscopio óptico, cuyos límites de resolución están en aproximadamente 0,2 μm [0,2 micrometros o 200 nanometros (nm)], y más adelante pasaremos a describir el microscopio electrónico, que es capaz de incrementar los límites del poder de resolución del microscopio óptico en aproximadamente 1000 veces.

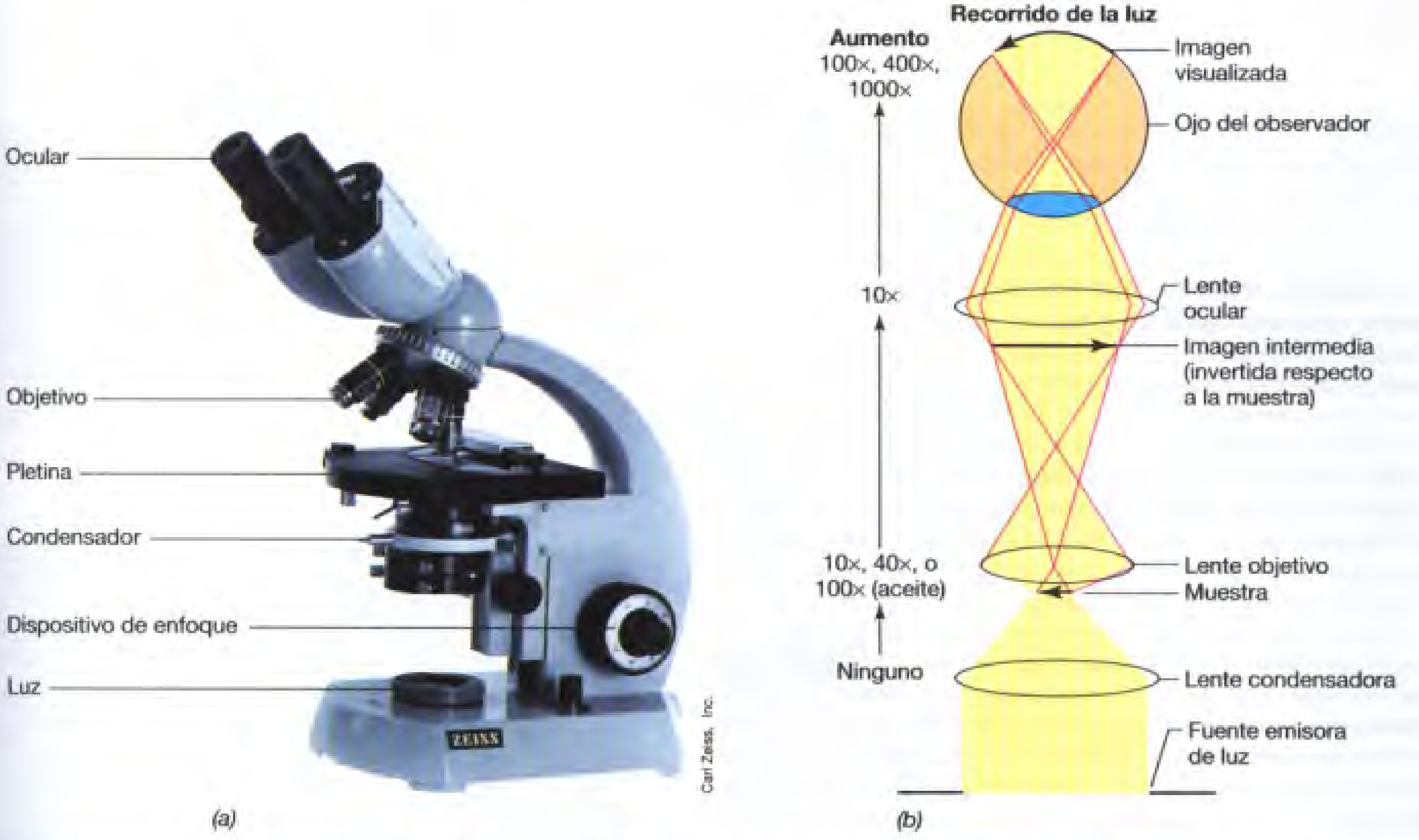
El microscopio óptico compuesto

El **microscopio óptico** ha sido una herramienta básica para el desarrollo de la microbiología como ciencia y sigue siendo un instrumento muy útil en la investigación microbiológica. Se utilizan en la actualidad varios tipos de microscopios ópticos: de *campo claro, contraste de fases, campo oscuro* y *fluorescencia*. El **microscopio de campo claro** es el que generalmente se emplea en cursos básicos de biología y de microbiologías y se compone de dos series de lentes (lentes del objetivo y lentes del ocular) que funcionan conjuntamente para producir la imagen (Figura 4.1). Con este tipo de microscopio las muestras se visualizan gracias a las diferencias de contraste entre ellas y el medio que las rodea. Las diferencias de contraste se producen porque las células absorben o dispersan la luz en diferentes grados. Muchas células bacterianas son difíciles de observar bien con el microscopio de campo claro debido a su falta de contraste con el entorno. Los microorganismos pigmentados son una excepción, pues su color añade contraste y mejora la visualización de las células (Figura 4.2).

Aumento y resolución

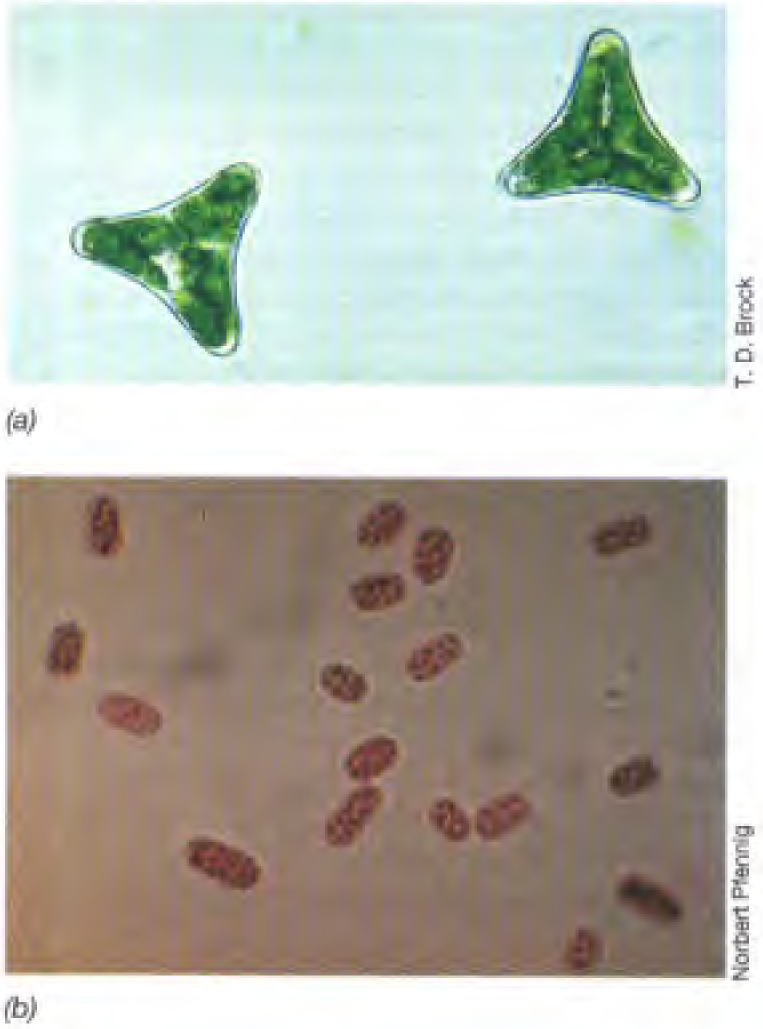
El aumento total de un microscopio compuesto es el *producto* del aumento debido a la lente del objetivo por el aumento de la lente del ocular (Figura 4.1*b*). Aumentos de 1500 veces están cercanos al límite superior de lo que se puede conseguir con un microscopio óptico compuesto. Este límite viene impuesto por la propiedad de la **resolución** de las lentes. El poder de resolución es una función de la longitud de onda de la luz utilizada y de una característica propia de las lentes denominada *apertura numérica* (una medida de la capacidad de captación de la luz por la lente). En general, hay una correlación entre la capacidad de aumento de una lente y su apertura numérica: las lentes de mayor aumento poseen generalmente mayores aperturas numéricas (la apertura numérica de una lente se suele marcar en ella al lado de su aumento). El diámetro del objeto más pequeño que se puede resolver es igual a 0,5 λ/apertura numérica, donde λ representa la longitud de onda de la luz usada. Por esta razón, la resolución aumenta cuando se usa luz azul para iluminar la muestra y la lente objetivo tiene una apertura numérica muy alta.

Como se ha indicado, la máxima resolución alcanzable en un microscopio óptico compuesto es de unos 0,2 μm. Esto significa que dos objetos que estén más próximos que esa distancia no podrán verse como entidades distintas y separadas. La mayoría de los microscopios utilizados en microbiología poseen oculares que aumentan de 10 a 15 veces y objetivos que aumentan de 10 a 100 veces (Figura 1.4*b*). Con aumentos de 1000 veces, los objetos de 0,2 μm de diámetro pueden apreciarse con dificultad. Con los objetivos de 100 aumentos, y con otros objetivos de apertura numérica muy elevada, se emplea aceite de inmersión para que no exista aire entre la preparación y el objetivo. Las lentes con las que se usa aceite de inmersión se denominan *objetivos de inmersión*. Este tipo de aceite se utiliza porque



Carl Zeiss, Inc.

Figura 4.1 (a) Microscopio óptico compuesto. Se indican algunas partes fundamentales del microscopio. (b) Trayectoria de la luz a través del microscopio compuesto. Además del ocular de 10×, existen oculares que proporcionan aumentos de 15-30×.



T. D. Brock

Norbert Pfennig

Figura 4.2 Micrografías de microorganismos pigmentados obtenidas mediante microscopía de campo claro. (a) Un alga verde (eucariota). (b) Una bacteria roja fototrofa (procariota). Las células del alga tienen un diámetro de unos 15 μm y el de las bacterias es aproximadamente 5 μm.

aumenta la capacidad de captación de luz por la lente, lo que facilita que los rayos que emergen de la muestra con gran ángulo (y que se perderían por no llegar a la lente objetivo de otro modo) sean captados y percibidos.

Tinciones: incremento del contraste para microscopía de campo claro

Una de las limitaciones ya señaladas de la microscopía de campo claro es el escaso contraste. Se pueden utilizar colorantes para teñir las células y aumentar así su contraste facilitando su observación. Los colorantes son compuestos orgánicos y cada tipo de colorante tiene afinidad por determinados componentes celulares. Muchos de los colorantes utilizados con frecuencia en microbiología están cargados positivamente (catiónicos) y se combinan fuertemente con constituyentes celulares cargados negativamente, como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos. Entre los colorantes catiónicos se pueden citar el *azul de metileno*, el *cristal violeta* y la *safranina*. Dado que las superficies celulares están, por lo general, cargadas negativamente, estos colorantes se combinan con estructuras de la superficie de las células y, por tanto, son excelentes colorantes de aplicación general.

Las tinciones más simples se realizan sobre preparaciones previamente secadas (Figura 4.3). Sobre un porta con una suspensión de microorganismos previamente secada y fijada, se derrama una pequeña cantidad de una solución diluida del colorante y se mantiene el contacto durante uno o dos minutos; a continuación, se lava varias veces con agua y se seca. Este tipo de preparación suele observarse con un objetivo de inmersión (Figura 4.3).

Las *tinciones diferenciales* son aquellas que no tiñen del mismo modo todos los tipos de células. Una tinción diferencial muy importante y ampliamente usada en bacteriología es la denominada *tinción de Gram* (Figura 4.4*a*). Dependiendo del resultado de esta tinción, las bacterias pueden dividirse en dos grandes grupos. **Gram positivas** y **Gram negativas**. Una vez terminada la tinción de Gram, las bacterias Gram positivas aparecen de color morado mientras que las Gram negativas presentan color rojo (Figura 4.4*b*). Estas diferencias en la tinción de Gram se deben a diferencias en la estructura de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas (como se verá más adelante en este mismo capítulo), de tal modo que el alcohol es capaz de decolorar las células Gram negativas pero no las Gram positivas (Figura 4.4). La tinción de Gram es

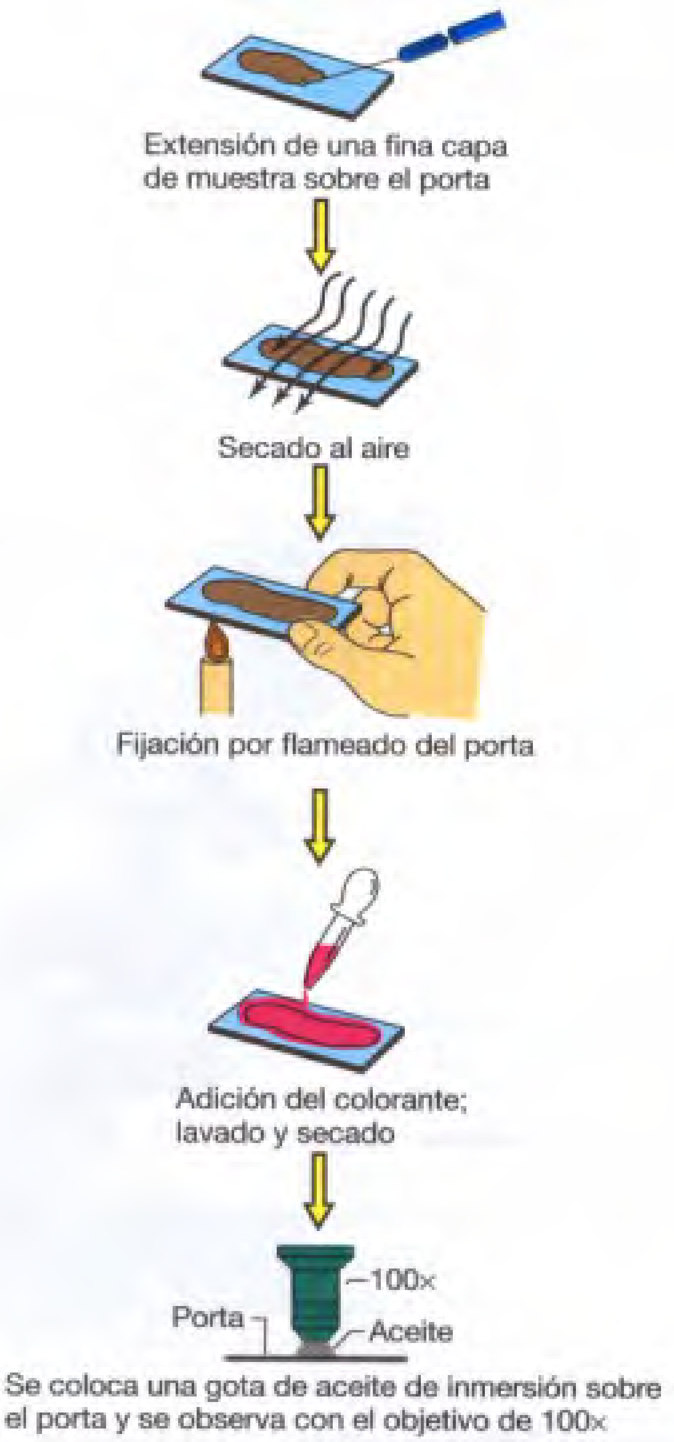

Extensión de una fina capa de muestra sobre el porta
Secado al aire
Fijación por flameado del porta
Adición del colorante; lavado y secado
100×
Porta
Aceite
Se coloca una gota de aceite de inmersión sobre el porta y se observa con el objetivo de 100×

Figura 4.3 Tinción de células para observación microscópica.

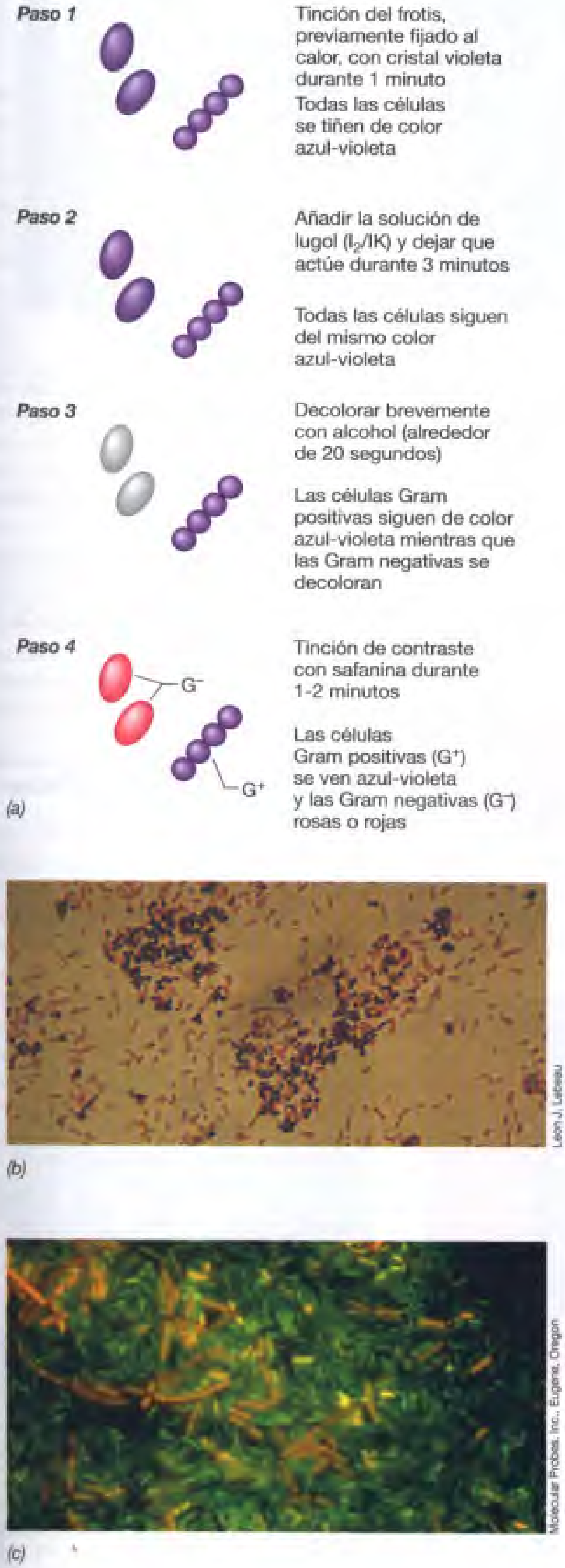
uno de los procedimientos de tinción más útiles en los laboratorios de bacteriología. Para identificar una bacteria desconocida es casi esencial determinar en primer lugar si es Gram positiva o Gram negativa. Si se dispone de un microscopio de fluorescencia (cuyas características se presentan más adelante), la tinción de Gram puede reducirse a un procedimiento de un solo paso que permite observar que uno y otro tipo de células presentan fluorescencia con colores distintos (Figura 4.4*c*).

Microscopios de contraste de fases, campo oscuro y fluorescencia

El **microscopio de contraste de fases** se desarrolló para mejorar las diferencias de contrate entre las células y el medio que las rodea, lo que permite su visualización sin necesidad de tinción (Figura 4.5). Este tipo de microscopía se basa en el hecho de que las células poseen un índice de refracción distinto al del medio y, por tanto, desvían los rayos de luz que las atraviesan. La luz que pasa a través de una muestra con índice de refracción diferente al del medio que la rodea sufre un cierto retrardo. Este efecto es amplificado por un anillo especial que posee el objetivo de los microscopios de contraste de fases, lo que da lugar a la formación de una imagen oscura sobre un fondo brillante (Figura 4.5*b*). Este tipo de microscopio se usa habitualmente en investigación porque permite la observación en montajes húmedos, donde la muestra permanece viable. Las tinciones, aunque se usan de forma generalizada en microscopía óptica, producen generalmente la muerte de las células y pueden distorsionar sus estructuras.

El **microscopio de campo oscuro** es un tipo de microscopio óptico en el que el sistema de iluminación se presenta modificado de tal modo que la luz incide sobre la muestra sólo desde los lados. La única luz que es capaz de entrar en el objetivo es la que es dispersada por la muestra y, por tanto, los microorganismos se observan brillantes sobre un fondo oscuro (Figura 4.5*c*). La resolución de los microscopios de campo oscuro es bastante alta y pueden observarse en ellos objetos difícilmente percibidos por microcopía de campo claro o de contraste de fases. La microscopía de campo oscuro también es un método excelente para observar la movilidad en los microorganismos, ya que permite resolver los penachos de flagelos mediante esta técnica (Figura 4.40*a*).

El **microscopio de fluorescencia** se utiliza para visualizar muestras capaces de emitir *fluorescencia;* es decir, capaces de emitir una determinada longitud de onda cuando previamente ha incidido sobre ellas una luz de menor lon-



Tinción del frotis, previamente fijado al calor, con cristal violeta durante 1 minuto

Todas las células se tiñen de color azul-violeta

Añadir la solución de lugol (I_2/IK) y dejar que actúe durante 3 minutos

Todas las células siguen del mismo color azul-violeta

Decolorar brevemente con alcohol (alrededor de 20 segundos)

Las células Gram positivas siguen de color azul-violeta mientras que las Gram negativas se decoloran

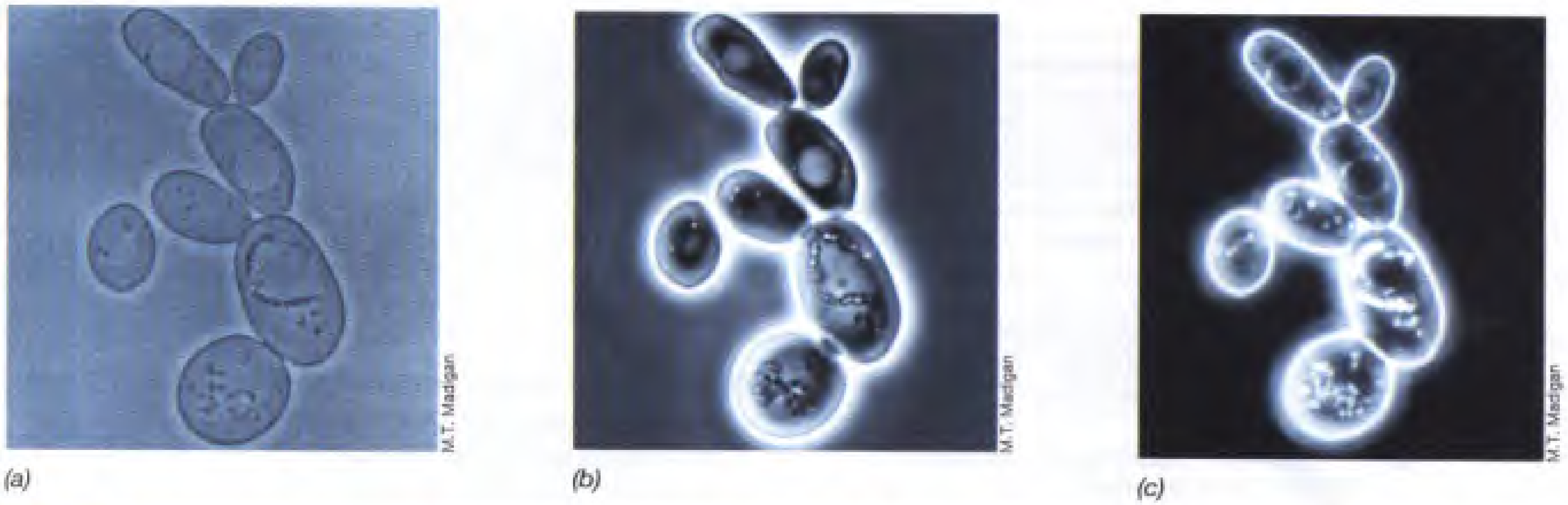
Tinción de contraste con safanina durante 1-2 minutos

Las células Gram positivas (G^+) se ven azul-violeta y las Gram negativas (G^-) rosas o rojas

Leon J. Lebeau

Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon

Figura 4.4 Tinción de Gram. (a) Pasos en la tinción de Gram. (b) Micrografía de bacterias Gram positivas (moradas) y Gram negativas (rosas) que se corresponden con *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, respectivamente. (c) Micrografía de células de *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativa, verde) y de *Bacillus cereus* (Gram positiva, naranja) teñidas por el método fluorescente de un solo paso **LIVE *Bac* Light** ™. Este método permite la diferenciación de células Gram positivas y Gram negativas mediante una tinción única.



M.T. Madigan

M.T. Madigan

M.T. Madigan

Figura 4.5 Micrografías de un mismo campo de observación con células de la levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae*, tomadas mediante distintos tipos de microscopios ópticos. (a) Campo claro. (b) Contraste de fases. (c) Campo oscuro. Las células presentan un diámetro de entre 8-10 μm.

gitud de onda (Figura 4.6). La fluorescencia puede ser debida a que determinadas células posean sustancias fluorescentes naturales como la clorofila u otros componentes fluorescentes (*autofluoresencia*) (*véase* Figura 4.6*a*, *b*) o por haber sido previamente tratadas con un colorante fluorescente (Figuras 4.4*c* y 4.6*c*). La microscopía de fluorescencia se usa habitualmente en diagnósticos microbiológicos así como en ecología microbiana (*véanse* Capítulos 19, 20 y 24).

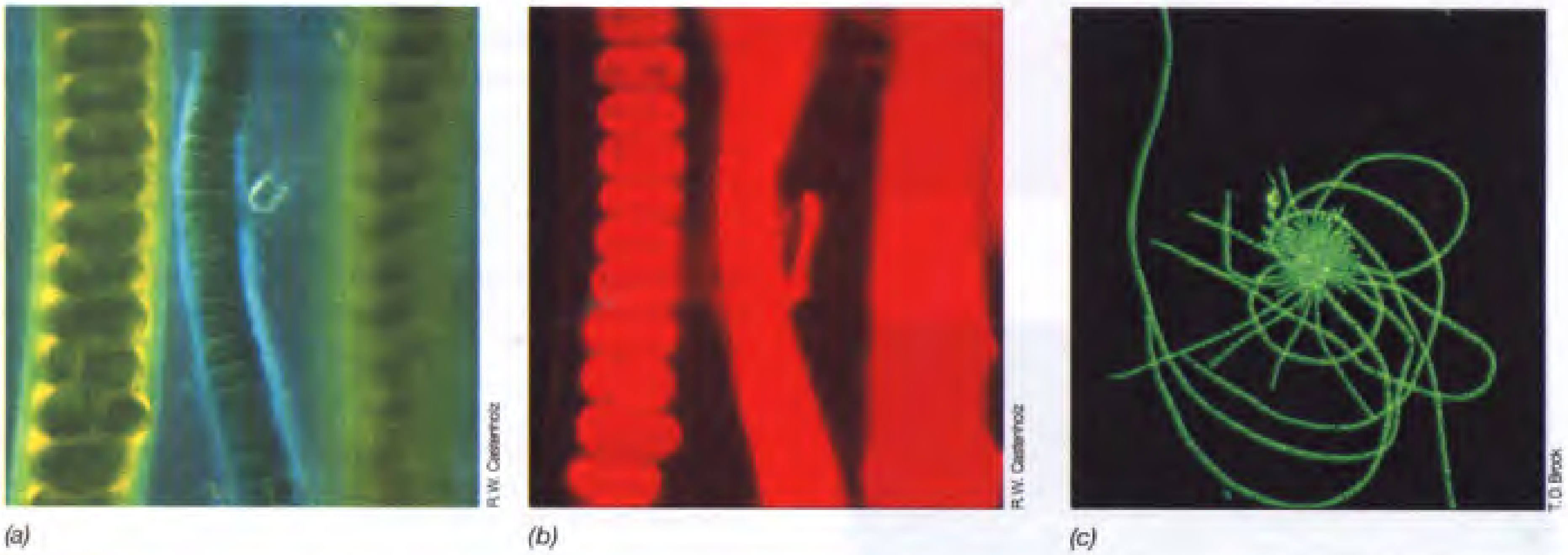
✓ 4.1 Revisión de conceptos

Los microscopios son esenciales en los estudios microbiológicos. Existen varios tipos de microscopios ópticos, como los de campo claro, contraste de fases, fondo oscuro y fluorescencia. En la microscopía de campo claro se requieren tinciones para aumentar el contraste.

- ✓ Defina el término *resolución*.
- ✓ ¿Cuál es el límite superior de aumento de un microscopio óptico?
- ✓ ¿Qué técnicas de microscopía óptica pueden mejorar en ocasiones la resolución?
- ✓ ¿Qué color presenta una bacteria Gram negativa tras la tinción de Gram por el método tradicional?

4.2 Imagen tridimensional: microscopía de contraste de interferencia, fuerza atómica y confocal

Una de las limitaciones de los tipos de microscopía óptica que hemos considerado es que las imágenes que se obtienen son esencialmente bidimensionales. Sin embargo, esta limitación puede ser superada. En la sección siguiente veremos



R.W. Castenholz

R.W. Castenholz

T.D. Brock

Figura 4.6 Micrografías de varios organismos en el microscopio de fluorecencia. (a, b) Cianobacterias. En (a) las células se observan por microsocopio de campo claro y en (b) las mismas células se visualizan mediante fluorescencia después de haber sido excitadas con luz de 546 nm. El color rojo se debe a la autofluorescencia de la clorofila y otros pigmentos. (c) Células de la bacteria filamentosa *Leucothrix mucor* teñidas con el colorante fluorescente naranja de acridina, que emite fluorescencia verde. Las células tienen 3 μm de diámetro y los filamentos pueden alcanzar longitudes superiores a los 100 μm.

que el microscopio electrónico de barrido ofrece una solución a este problema, pero ahora consideraremos algunas formas de microscopía óptica que también pueden hacerlo.

Microscopía de contraste de interferencia diferencial

La microscopía de **contraste de interferencia diferencial** (**DIC**, de *Differential Interference Contrast*) es una forma de microscopía óptica que emplea una fuente de luz polarizada. Esta luz polarizada pasa a través de un prisma que genera dos haces diferentes de luz, los cuales atraviesan la muestra y entran en la lente del objetivo. Aquí los dos rayos de luz se combinan y, debido a pequeñas diferencias en el índice de refracción de las sustancias que cada rayo ha atravesado, los dos rayos combinados no están en la misma fase, lo que crea como resultado un efecto de interferencia. Este efecto intensifica diferencias muy sutiles de la estructura celular y así, mediante este tipo de microscopía, objetos como el núcleo de las células eucarióticas (Figura 4.7*a*), las esporas, las vacuolas, ciertos gránulos y otras estructuras similares adquieren una apariencia tridimensional. La microscopía de contraste de interferencia es particularmente útil para la observación de células no teñidas, por su capacidad para generar imágenes que ponen de manifiesto estructuras celulares internas que no son fácilmente aparentes (o que incluso resultan por completo invisibles) cuando se utiliza la microscopía de fondo claro (compárese la Figura 4.5*a* y *b* con la Figura 4.7*a*).

Microscopía de fuerza atómica

Otra forma de microscopía que resulta muy útil para producir imágenes tridimensionales de estructuras biológicas es la que utiliza el **microscopio de fuerza atómica** (**AFM**, de *Atomic Force Microscope*). En la microscopía de fuerza atómica se sitúa una fina aguja como sonda muy próxima a la muestra que se va analizar, de tal modo que se establecen fuerzas atómicas débiles de repulsión entre la sonda y la muestra. Cuando la muestra se recorre tanto en dirección vertical como horizontal la sonda reproduce los valles y las colinas de la muestra, registrando constantemente las interacciones con la superficie. Estas señales se registran en una serie de detectores que generan información digital a una computadora, la cual reproduce la imagen (Figura 4.7*b*). Aunque las imágenes que se obtienen con un microscopio de fuerza atómica son similares a las derivadas de un microscopio electrónico de barrido (compárese la Figura 4.7*b* con la Figura 4.10*b*), la microscopía de fuerza atómica tiene la gran ventaja de que la preparación de la muestra es la misma que para la microscopía de fondo claro (es decir, no requiere ni fijación ni inclusión). Además permite la observación de muestras vivas e hidratadas, algo que en general no es posible con los microscopios electrónicos.

Microscopía confocal

La **microscopía confocal** de barrido con láser (**CSLM**, de *Confocal Scanning Laser Microscopy*) se basa en un microscopio computerizado que acopla una fuente de luz láser a un microscopio óptico. Esta técnica permite producir imágenes digitales tridimensionales de microorganismos y otras muestras biológicas (Figura 4.8). En la microscopía confocal, un rayo láser se refleja en un espejo que lo dirige a un sistema de barrido y luego a un sistema de precisión que ajusta el plano de foco del rayo a una determinada capa vertical dentro de la muestra. Mediante la iluminación concreta de un solo plano de la muestra, la intensidad de iluminación disminuye rápidamente por encima y por debajo de ese plano, y en consecuencia la luz perdida en los otros planos es mínima. De este modo, en una muestra relativamente gruesa, como por ejemplo en un biofilm microbiano (Figura 4.8), no sólo se observarán las células de la superficie del biofilm, como ocurriría en el caso de la microsco-

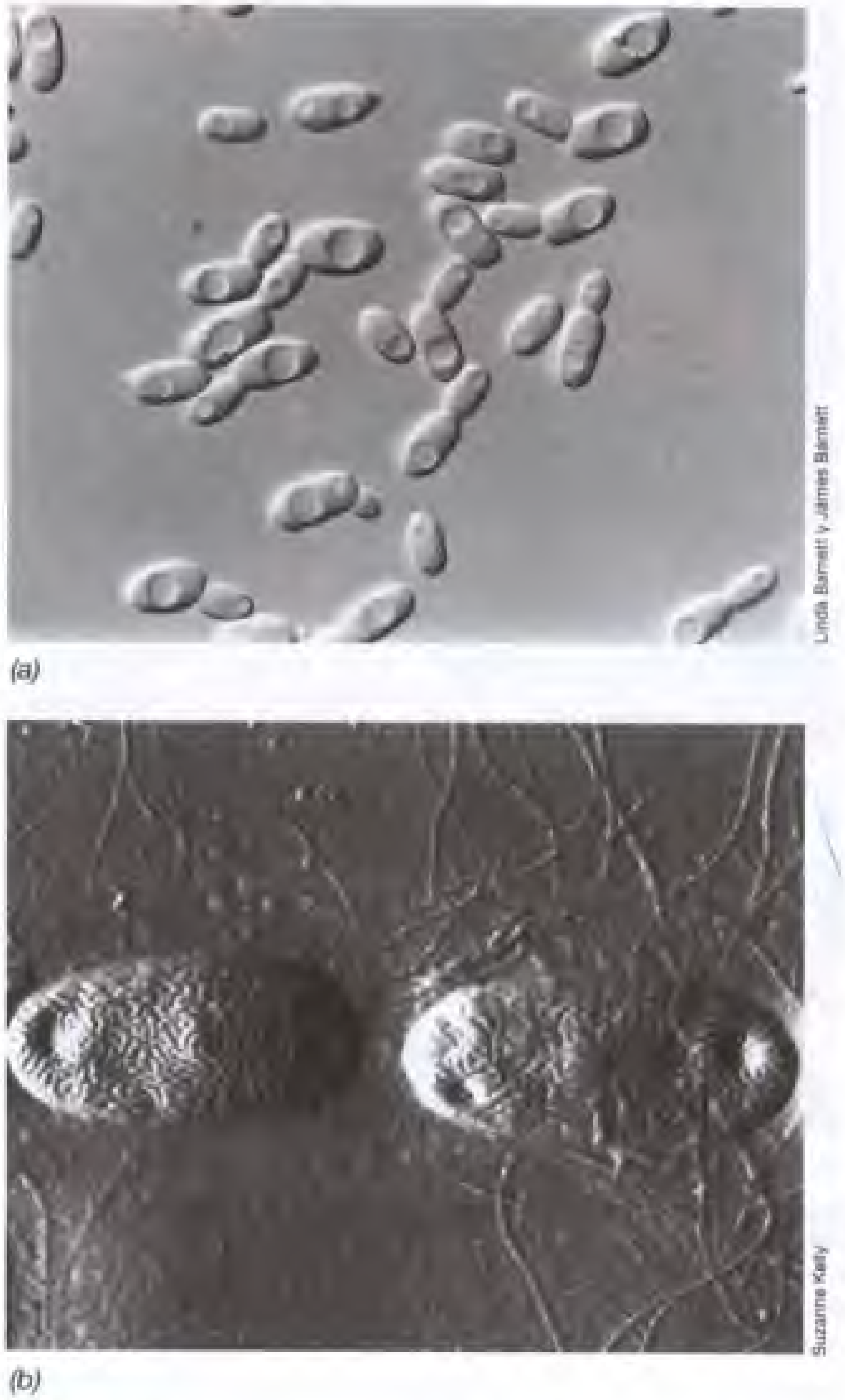
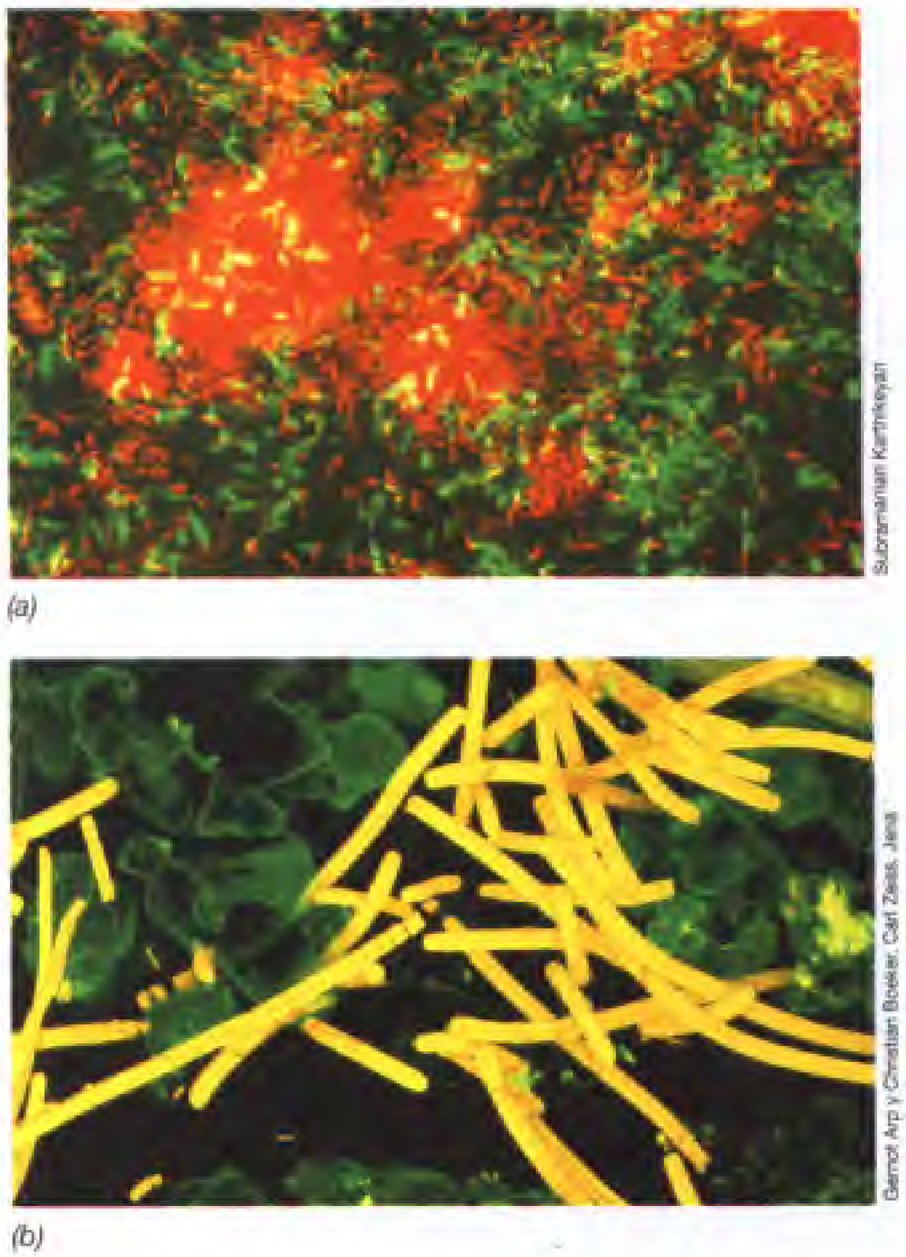


Figura 4.7 Imagen tridimensional de células mediante (a) microscopía de contraste de interferencia diferencial y (b) microscopía de fuerza atómica. Las células de levadura en (a) tienen unos 8 μm de diámetro. Puede distinguirse claramente el núcleo (compárese esta figura con la Figura 4.5a). Las bacterias que se presentan en (b) tienen una longitud de 2,2 μm y proceden de un biofilm natural que se desarrolló sobre un porta inmerso en el agua del comedero de un perro durante 24 horas. El porta se secó antes de la observación por el microscopio de fuerza atómica.



Subramanian Karthikeyan

(a)

Gernot Arp y Christian Boeker, Carl Zeiss, Jena

(b)

Figura 4.8 Microscopía confocal por láser. (a) Se muestra la imagen confocal de una comunidad microbiana mixta de un biofilm cultivado en el laboratorio. Las células bacilares verdes son *Pseudomonas aeruginosa*. Otras células de diferentes colores se presentan a diferentes profundidades dentro del biofilm. (b) Micrografía confocal de una cianobacteria filamentosa creciendo en un lago bicarbonatado.

pía óptica convencional, sino también las células de las diversas capas ajustando el plano de foco del rayo láser.

En la microscopía confocal se suelen teñir las preparaciones celulares con colorantes fluorescentes para hacerlas más fácilmente visibles (Figura 4.8*a*). Por otra parte, también se pueden crear falsos colores ajustando de tal modo el microscopio que las diferentes capas se nos presenten en colores diferentes. El microscopio confocal con láser está equipado con programas de computadora que reunen las imágenes digitales obtenidas y permiten su posterior procesamiento. En concreto, las imágenes obtenidas de las diferentes capas se pueden almacenar y luego superponer digitalmente para reconstruir la imagen tridimensional de la muestra completa (Figura 4.8*a*). La microscopía confocal tiene un uso muy extendido en ecología microbiana, especialmente en la identificación de las poblaciones celulares filogenéticamente distintas que están presentes en un hábitat determinado (*véase* por ejemplo la Figura 18.11*b*), pero su utilidad se extiende a cualquier situación que requiera examinar en profundidad muestras de relativo espesor en cuanto a su contenido microbiano.

✓ 4.2 Revisión de conceptos

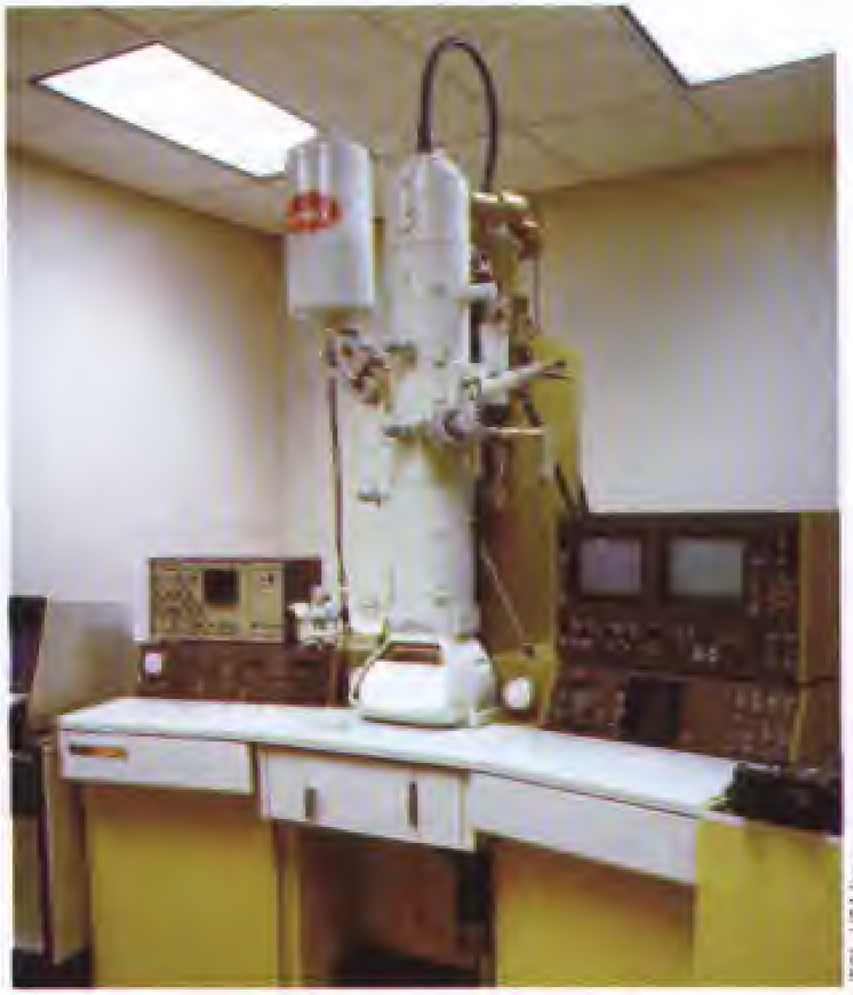
La microscopía de contraste de interferencia (DIC) y la microscopía confocal (CSLM) son formas de microscopía óptica que permiten visualizar las imágenes en tres dimensiones mucho mejor que las otras opciones de microscopía óptica, y además la confocal permite disponer de imágenes obtenidas a través de muestras gruesas. La microscopía de fuerza atómica produce una imagen tridimensional detallada de muestras vivas.

✓ ¿Por qué es más fácil observar la estructura de las células eucarióticas mediante microscopía de contraste diferencial?

✓ ¿Cómo es capaz la microscopía confocal de producir imágenes de distintas capas de una preparación gruesa?

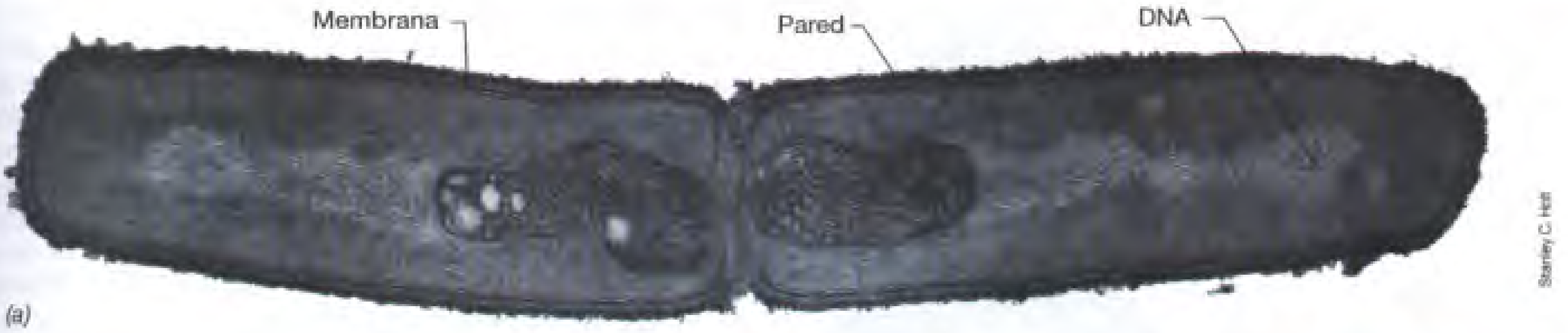
4.3 Microscopía electrónica

Los **microscopios electrónicos** se usan habitualmente para el estudio detallado de estructuras celulares. Para el estudio de las estructuras internas es esencial el **microscopio electrónico de transmisión (MET)** (**TEM**, de *Transmission Electron Microscope*). En el TEM se utilizan electrones en lugar de rayos de luz, y las lentes son electromagnéticas, operándose en todo momento a alto vacío (Figura 4.9). El poder de resolución del microscopio electrónico es mucho mayor que el del microscopio óptico, pudiéndose observar incluso estructuras moleculares como proteínas y ácidos nucleicos (*véase* Figura 2.4*b*). Sin embargo, los haces de electrones tienen escaso poder de penetración e incluso una célula aislada es demasiado gruesa para poder visualizarse directamente. Por este motivo se emplean técnicas especiales

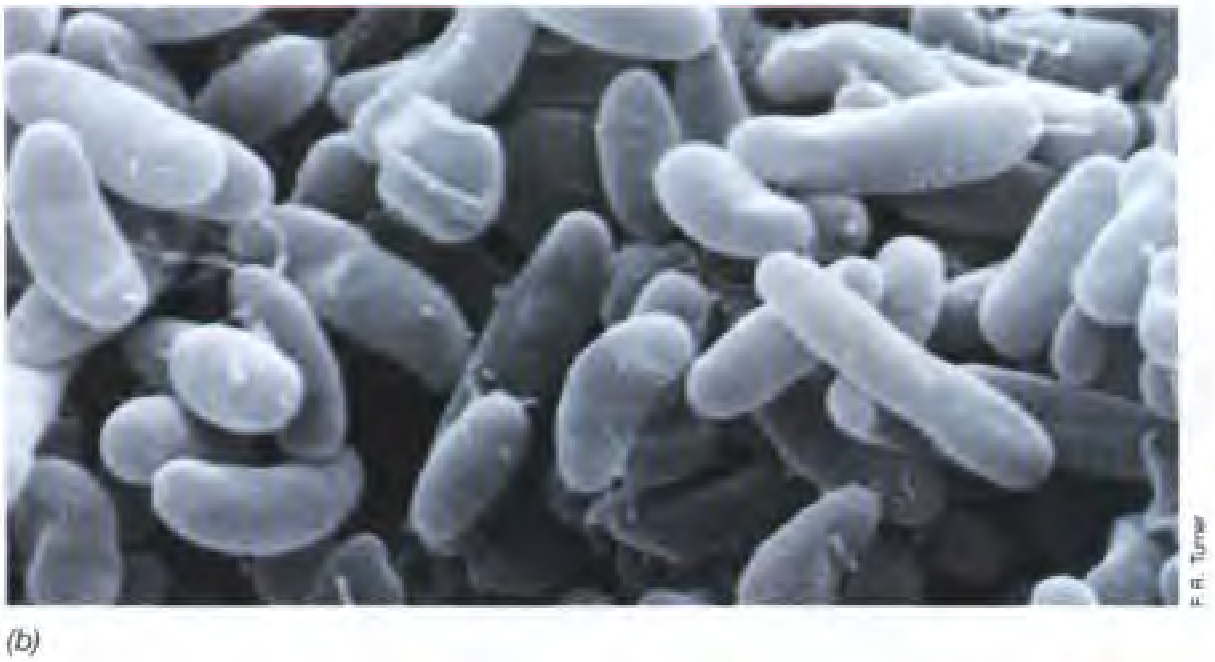


JEOL, USA Inc.

Figura 4.9 Un microscopio electrónico. Este aparato realiza tanto microscopía de transmisión como de barrido.



Stanley C. Holt



F. R. Turner

Figura 4.10 Micrografías electrónicas de bacterias tomadas con (a) microscopio electrónico de transmisión y (b) microscopio electrónico de barrido. (a) Corte fino de una bacteria Gram positiva típica, *Bacillus subtilis*. La célula acaba de dividirse y dos estructuras membranosas se anclan en el tabique. Obsérvese la región clara central, que corresponde al DNA o nucleoide. La célula tiene un diámetro aproximado de 0,8 μm. (b) Células de la bacteria fototrofa *Rhodospirillum sodomense*. La anchura de cada célula individual es de unos 0,75 μm.

para la obtención de *cortes ultrafinos* a fin de poder visualizar las muestras. Una célula bacteriana, por ejemplo, se corta con una cuchilla especial en varios cortes ultrafinos (de 20-60 nm de espesor) que son posteriormente visualizados de manera individual en el microscopio electrónico (*véase* Figura 4.10*a*). Para obtener suficiente contraste, las preparaciones se tiñen previamente mediante tratamiento con compuestos como el ácido ósmico, permanganato, sales de uranio o de lantano, o plomo. Como estas sustancias poseen átomos pesados, son capaces de desviar los electrones y aumentar el contraste (*véase* Figura 4.10*a*).

Microscopía electrónica de barrido

Cuando en una muestra sólo se pretende estudiar las estructuras externas de un organismo no son necesarios los cortes ultrafinos, pudiéndose realizar la observación de las células intactas o de los componentes celulares de modo directo por MET tras una técnica denominada *tinción negativa* (*véase*, por ejemplo, Figura 4.39). Por otra parte, se puede utilizar el **microscopio electrónico de barrido** (MEB) (**SEM**, de *Scanning Electron Microscope*) (Figuras 4.9 y 4.10*b*). La muestra a estudiar mediante este instrumento, primero se recubre con una fina capa de un metal pesado, como el oro. El haz de electrones del MEB barre la superficie de la muestra y los electrones desviados por la capa de metal son recogidos y proyectados sobre una pantalla para producir una imagen (Figura 4.10*b*). En el MEB se pueden observar muestras de cierto tamaño y la profundidad de campo es excelente. Además, permite obtener un amplio rango de aumentos, desde 15 hasta 100.000 veces, pero sólo se puede ver la *superficie* de los objetos. Todos los microscopios electrónicos incorporan cámaras que permiten fotografiar las muestras. Este tipo de fotografías se denominan *micrografías electrónicas*.

✓ 4.3 Revisión de conceptos

Los microscopios electrónicos tienen mucho mayor poder de resolución que los microscopios ópticos, con límites de resolución de alrededor de 0,2 nm. Existen dos tipos principales de microscopía electrónica: la de transmisión, que permite observar estructuras celulares internas hasta el nivel molecular, y la de barrido, que proporciona imágenes tridimensionales y permite el examen de las superficies celulares.

- ✓ ¿Qué es una *micrografía electrónica*?
- ✓ Considerando que los microscopios electrónicos requieren la fijación química previa de las muestras y que funcionan en condiciones de alto vacío, cite las principales *desventajas* de los microscopios electrónicos respecto a los microscopios ópticos.
- ✓ ¿Qué tipo de microscopio electrónico usaría para observar el nucleoide bacteriano?

4.4 Morfología celular y la importancia de ser pequeño

En biología, el término *morfología* hace referencia a la *forma* de un organismo. Entre los procariotas se presentan varias morfologías y existen términos apropiados para describirlas. Presentaremos estas formas y estos términos, y consideraremos luego algunas de las ventajas biológicas que se presentan en las células de tamaño pequeño.

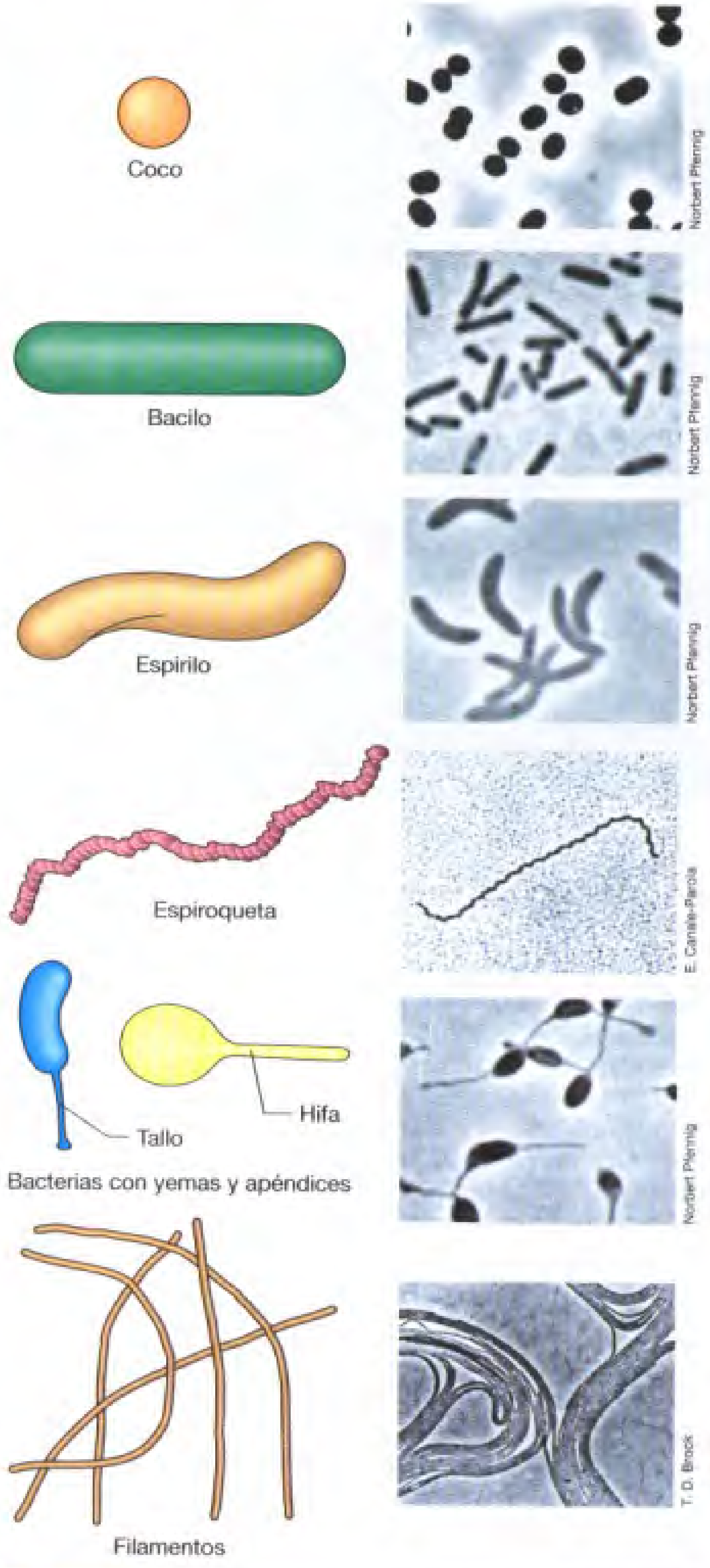


Figura 4.11 Formas celulares representativas de diferentes morfologías en procariotas. Al lado de cada dibujo se muestra un ejemplo de cada morfología. Los organismos son el coco *Thiocapsa roseopersicina* (diámetro = 1,5 μm), el bacilo *Desulforomonas acetoxidans* (diámetro= 1μm), el espirilo *Rhodospirillum rubrum* (diámetro = 1 μm), la espiroqueta *Spirochaeta stenostrepta* (diámetro = 0,25 μm), el organismo gemante y con apéndices *Rhodomicrobium vannielii* (diámetro = 1,2 μm) y la bacteria filamentosa *Chloroflexus aurantiacus* (diámetro = 0,8 μm).

Principales tipos morfológicos

En la Figura 4.11, se muestran algunas representaciones esquemáticas de morfologías bacterianas típicas junto con micrografías obtenidas por contraste de fases. A las bacterias con forma esférica u ovoide se les denomina **cocos**. A las bacterias con forma cilíndrica se les denomina **bacilos**. Algunos bacilos se curvan en forma espiral, y se llaman entonces **espirilos**. Las células de muchos procariotas se mantienen juntas después de la división celular formando grupos, y estas asociaciones frecuentemente son características de diferentes organismos. Por ejemplo, algunos cocos o bacilos pueden formar largas cadenas. En otras ocasiones, los cocos pueden formar finas capas de células, estructuras tridimensionales cúbicas o agrupaciones irregulares.

Varios grupos de bacterias pueden ser inmediatamente reconocidas gracias a sus formas peculiares. Por ejemplo, las **espiroquetas**, que son bacterias con forma de sacacorchos, las **bacterias con apéndices**, que presentan protuberancias celulares en forma de largos tubos o tallos, o las **bacterias filamentosas**, que forman células largas y delgadas o cadenas de células (Figura 4.11). La Figura 4.11 muestra morfologías que son *representativas*, pero son posibles muchas variaciones de estos tipos morfológicos básicos.

Tamaño de las células microbianas y la importancia de ser pequeño

Los procariotas presentan tamaños que van desde 0,1-0,2 μm de ancho a más de 50 μm de diámetro. Algunos procariotas excepcionalmente grandes, como *Epulopiscium fishelsoni* (Figura 4.12) simbionte del pez cirujano, pueden alcanzar 50 μm de diámetro y llegar a los 0,5 mm de largo.

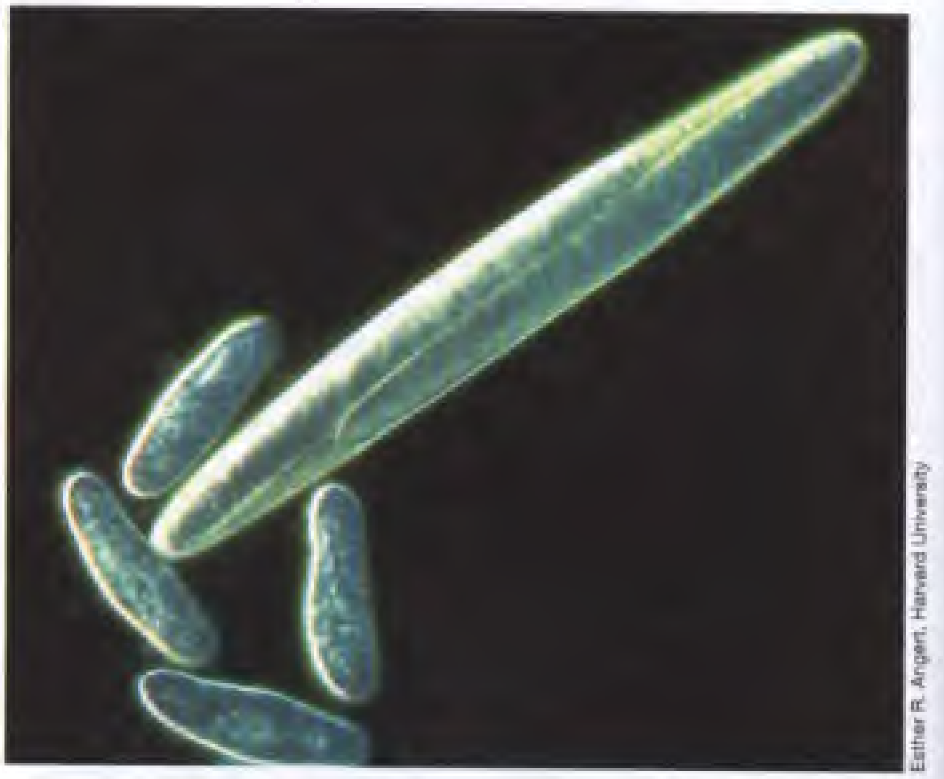


Figura 4.12 Micrografía por microscopía de campo oscuro de un procariota gigante, *Epulopiscium fishelsoni*, simbionte del pez cirujano. Este bacilo mide unos 600 mm (0,6 mm) de largo y se muestra junto a cuatro células del protozoo *Paramecium* (eucariota), cada una de las cuales mide 150 μm de longitud. *E. fishelsoni* es una bacteria filogenéticamente relacionada con especies del género *Clostridium*.

Sin embargo, las dimensiones de un eucariota de tipo medio, como la bacteria *Escherichia coli*, son de 1 × 3 μm (Figura 4.13). A efectos comparativos, una célula eucariótica típica puede variar de 2 a más de 200 μm de diámetro. Por tanto, la mayoría de los procariotas son mucho más pequeños que los eucariotas y el tamaño pequeño de los procariotas determina algunas de sus propiedades biológicas. Por ejemplo, la velocidad con la que los nutrientes entran al interior de la célula y salen al exterior de la misma las sustancias de desecho, lo que constituye un factor clave porque influye en los ritmos metabólicos celulares y en la velocidad de crecimiento, es, en general, *inversamente* proporcional al tamaño celular. Este hecho se debe a que las velocidades de transporte son, en parte, dependientes de la *superficie de membrana disponible* respecto al volumen. Con relación a su tamaño, las células pequeñas tienen más superficie relativa disponible que las grandes. Esto se hace más patente en el caso de los cuerpos esféricos, en los que el *volumen* es una función del cubo del radio ($V = \frac{4}{3}\pi r^3$) mientras que la *superficie* es función del cuadrado del radio ($S = 4\pi r^2$). La relación superficie/volumen (S/V) de una esfera puede ser expresada como $3/r$ (Figura 4.14). Por tanto, una célula con un radio pequeño posee una relación S/V *mayor* que una grande, y de ahí que pueda llevar a cabo un intercambio de nutrientes con el medio en condiciones más ventajosas.

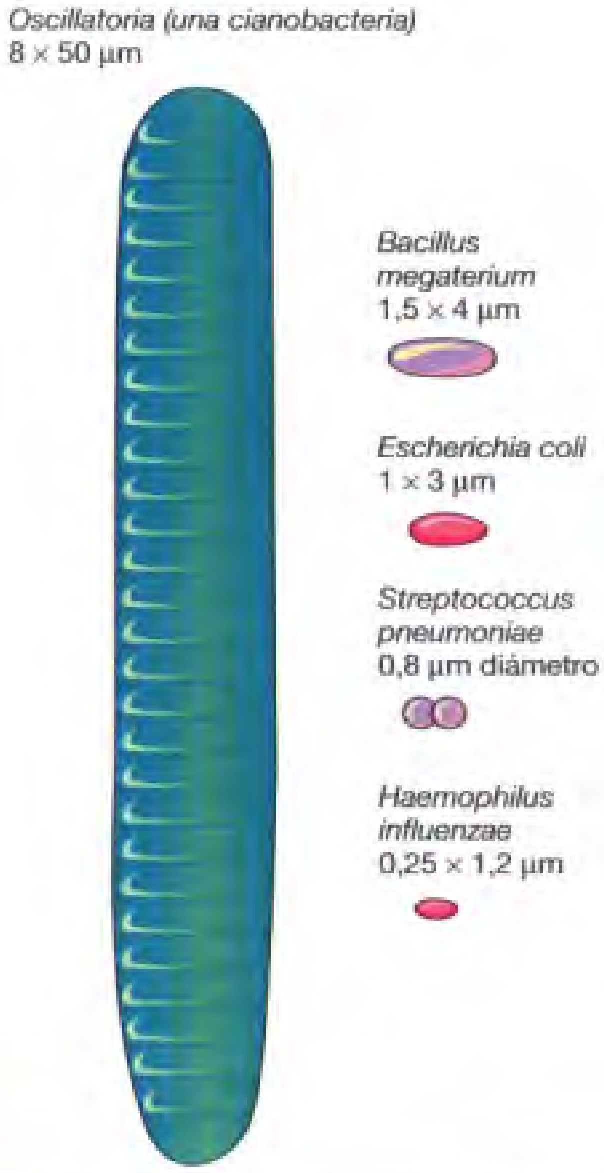


Figura 4.13 Tamaños comparativos de distintos procariotas. En la mayor parte de los procariotas conocidos el diámetro de las células varía de 0,5 a 2 μm.

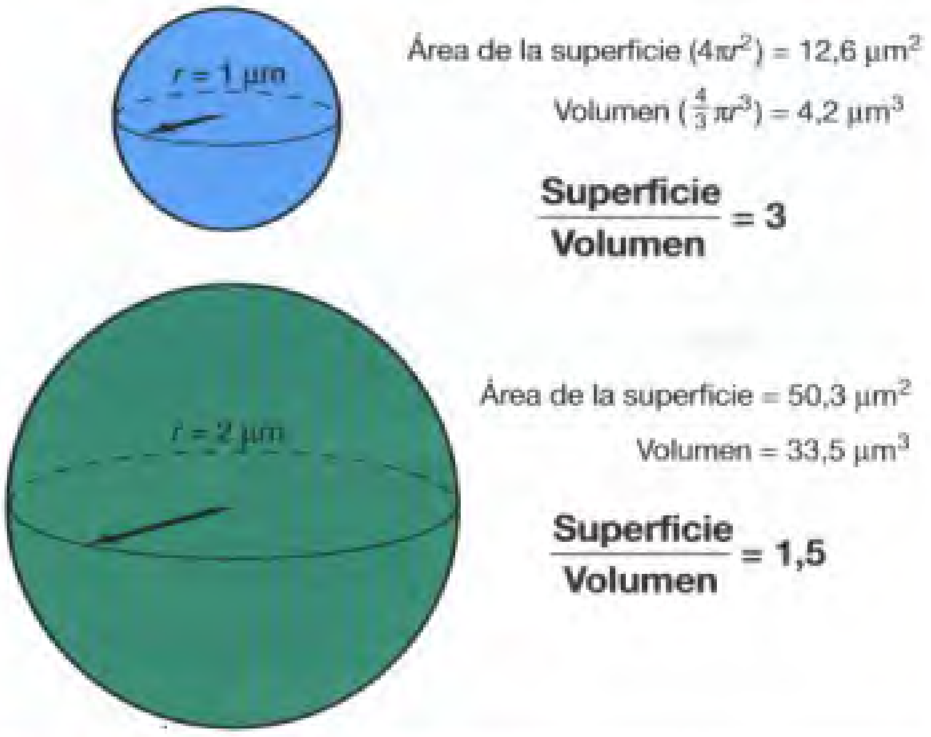

r = 1 μm
Área de la superficie ($4\pi r^2$) = 12,6 μm²
Volumen ($\frac{4}{3}\pi r^3$) = 4,2 μm³
$\frac{\text{Superficie}}{\text{Volumen}} = 3$
r = 2 μm
Área de la superficie = 50,3 μm²
Volumen = 33,5 μm³
$\frac{\text{Superficie}}{\text{Volumen}} = 1{,}5$

Figura 4.14 Relación entre el área superficial y el volumen celular. El *aumento* del tamaño celular implica una *disminución* de la relación superficie/volumen.

Esta relación diferencial S/V es una ventaja para las células pequeñas, que a igualdad de recursos se manifiesta en velocidades de crecimiento más rápidas y en la formación de poblaciones celulares más grandes respecto a las células de mayor tamaño. Los parámetros mencionados, tasas de crecimiento más rápidas y mayores tamaños de población, afectan a su vez a la ecología microbiana pues un gran número de células con elevada actividad metabólica origina cambios importantes en un ecosistema, incluso en periodos de tiempo relativamente cortos. Estos aspectos se tratarán con más detalle en los Capítulos 18, 19, 21 y 26-29, cuando consideremos los microorganismos en sus hábitat naturales.

Algunos microbiólogos han sugerido que en la naturaleza existen bacterias *extremadamente* pequeñas, que se conocen como *nanobacterias*. La mayor parte de los trabajos sobre nanobacterias están relacionados con su supuesto papel en la formación de precipitados y biofilms (*véase* Sección 19.3) en ambientes tan diversos como las superficies minerales y los tejidos humanos. El tamaño de estas posibles bacterias es del orden de 0,1 μm de diámetro en el caso de formas cocoides, es decir, muy pequeñas incluso para los procarióticos estándar. Quienes se oponen a la existencia de nanobacterias suponen que son simples artefactos originados a partir de materiales inertes por reacciones químicas o geoquímicas y que incluso las bacterias más pequeñas conocidas son significativamente mayores que las nanobacterias descritas. Los oponentes también indican que, teniendo en cuenta el espacio requerido para acumular todas las moléculas esenciales de la vida, resulta muy improbable que éstas puedan existir en los volúmenes disponibles por estas formas. La cuestión de las nanobacterias es tema de controversia, pero si realmente tales células tan diminutas existieran serían las estructuras vivas más pequeñas conocidas.

✓ 4.4 Revisión de conceptos

Los procariotas son normalmente de menor tamaño que los eucariotas y presentan una amplia variedad de morfologías. El tamaño pequeño de los procariotas influencia su fisiología, su velocidad de crecimiento y su ecología.

- ✓ Cite tres tipos morfológicos de procariotas.
- ✓ ¿Qué propiedad física aumenta en las células a medida que son más pequeñas?

II MEMBRANAS Y PAREDES CELULARES

A continuación trataremos de dos estructuras celulares muy importantes: la membrana celular y la pared celular. Cada una de ellas lleva a cabo funciones vitales bien definidas como el transporte de nutrientes (membrana) o la protección frente a la lisis osmótica (pared).

4.5 Estructura de la membrana citoplasmática

La membrana citoplasmática es una estructura fina que rodea completamente la célula. Es una estructura vital de tan sólo unos 8 nm de espesor que constituye la barrera que separa el interior de la células (el citoplasma) del exterior. Si se rompe la membrana, se destruye la integridad de la célula, liberándose al medio los componentes que la integran y produciéndose la muerte celular. La membrana citoplasmática actúa también como *una barrera muy selectiva*, permitiendo que en el interior de la célula se concentren determinados metabolitos y se excreten las sustancias de desecho.

Composición química de las membranas

La estructura general de la mayoría de las membranas biológicas es una **bicapa lipídica** (Figura 4.15). Como se ha comentado en la Sección 3.4, los fosfolípidos poseen tanto regiones altamente hidrofóbicas (ácidos grasos) como regiones relativamente hidrofílicas (glicerol), y pueden presentarse en múltiples formas químicas distintas debido a la variación en la composición de ácidos grasos y de los compuestos fosforilados que se unen al esqueleto de glicerol. Cuando los fosfolípidos se agregan en soluciones acuosas tienden a formar bicapas de manera espontánea; los ácidos grasos se orientan hacia el interior, manteniéndose en un ambiente hidrofóbico, mientras que las porciones hidrofílicas son las expuestas a la fase acuosa (Figura 4.15). La estructura de bicapa en las membranas representa probablemente la organización más estable que pueden alcanzar las moléculas lipídicas en un entorno acuoso.

En el microscopio electrónico se pueden visualizar cortes finos de la membrana citoplasmática y la Figura 4.16*a* muestra un ejemplo representativo. En microscopía electrónica de alta resolución, las membranas se observan como dos líneas claras separadas por una zona más oscura (Figura 4.16*a*). Esta **unidad de membrana**, como se denomina, consta de una bicapa de fosfolípidos (*véase* Figura 3.7) en la que existen proteínas embebidas (Figura 4.17). Las principales proteínas de membrana poseen una región altamente hidrofóbica que interacciona con las zonas apolares de los ácidos grasos, y atraviesan las membranas presentando regiones superficiales tanto en el exterior como en el interior de la célula (Figura 4.17). La estructura global de la membrana citoplasmática se estabiliza mediante puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Además, algunos cationes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} también contribuyen a la estabilización de la membrana a través de interacciones iónicas con los grupos polares de carga negativa presentes en los fosfolípidos.

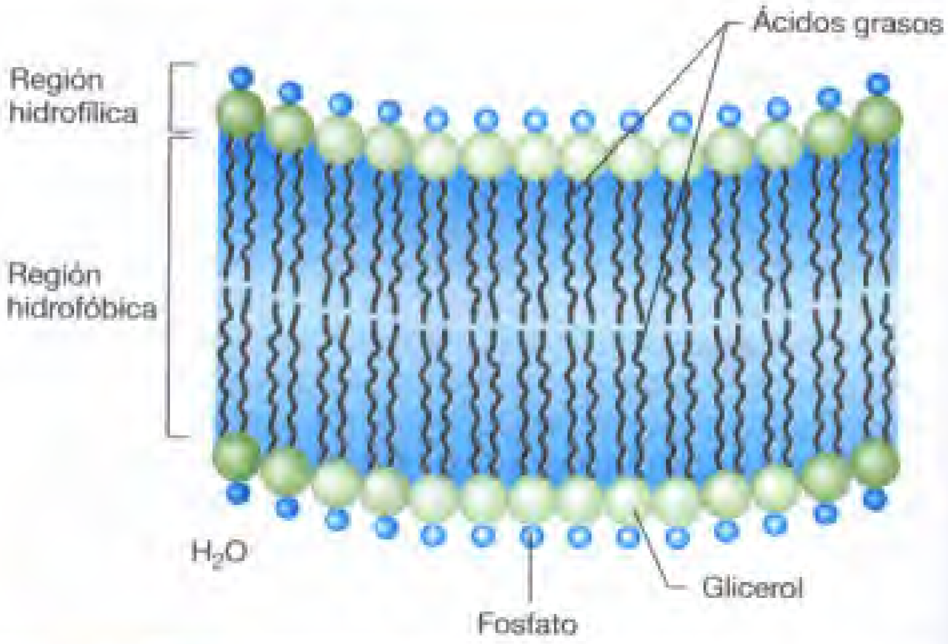


Figura 4.15 Estructura de una bicapa lipídica. La membrana *citoplasmática* tiene una anchura de 8 nm (80 angstroms).

Otras características de la membrana citoplasmática

La capa externa de la membrana citoplasmática se orienta hacia el exterior y, en algunas bacterias, contacta con una variedad de proteínas implicadas en la unión de sustratos y el procesamiento de grandes moléculas para su transporte al interior celular (proteínas periplásmicas) (*véanse* los comentarios de las Secciones 4.7 y 4.9). La cara interna de la membrana citoplasmática se orienta hacia el citoplasma e interacciona con proteínas involucradas en reacciones de obtención de energía y otras importantes funciones celulares. Algunas de las proteínas situadas en el periplasma (que es la región situada entre la membrana interna y la membrana externa de las bacterias Gram negativas, *véase* Sección 4.9) y algunas de las localizadas en la cara interna de la membrana se asocian firmemente a ésta, comportándose como proteínas unidas a membrana. Aunque en realidad no son proteínas integrales de membrana, estas proteínas interaccionan directamente con las de la membrana para llevar a cabo determinados procesos celulares. Se ha visto que algunas de estas *proteínas periféricas de membrana*, como se las denomina, son lipoproteínas y contienen una cola lipídica en el extremo aminoterminal que permite su anclaje a la membrana.

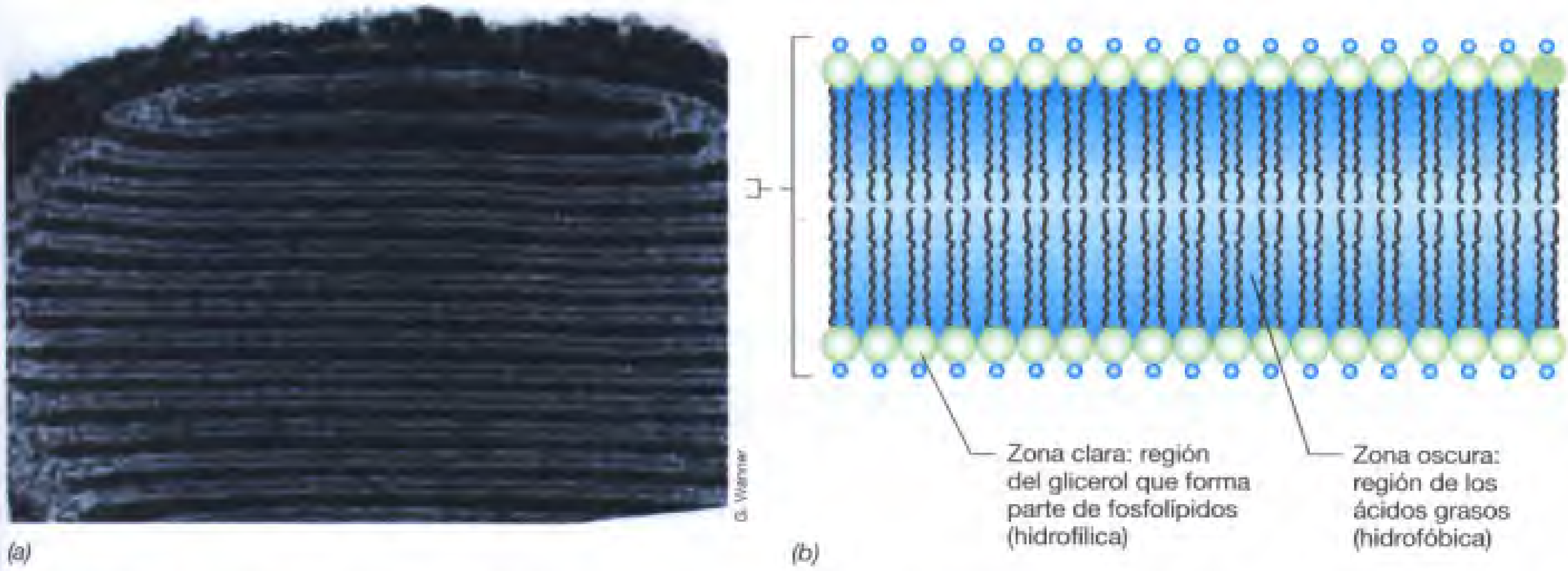

G. Wanner
(a)
(b)
Zona clara: región del glicerol que forma parte de fosfolípidos (hidrofílica)
Zona oscura: región de los ácidos grasos (hidrofóbica)

Figura 4.16 Membrana *citoplasmática*. (a) Micrografía electrónica de los apilamientos de membranas fotosintéticas que derivan de la membrana *citoplasmática* en la bacteria *Halorhodospira halochloris*. Se obseran las diferentes bicapas lipídicas (unidades de membrana). Cada bicapa tiene una anchura de 8 nm. (b) Esquema ampliado de (a) mostrando una unidad de membrana.

A pesar de que las representaciones esquemáticas de las membranas tienen un aspecto rígido (Figuras 4.16 y 4.17), la membrana citoplasmática es en realidad bastante fluida, pues los fosfolípidos y las proteínas presentan una considerable libertad de movimiento dentro de la membrana. Las medidas de viscosidad de las membranas demuestran que su viscosidad es semejante a la de los aceites de bajo grado. Por tanto, las membranas pueden ser consideradas como un *mosaico fluido* en el que existen proteínas globulares con orientaciones específicas que atraviesan la bicapa lipídica, que presenta a la vez una estricta organización y una elevada movilidad. Este tipo de organización confiere importantes propiedades funcionales a las membranas que se discuten en la próxima sección.

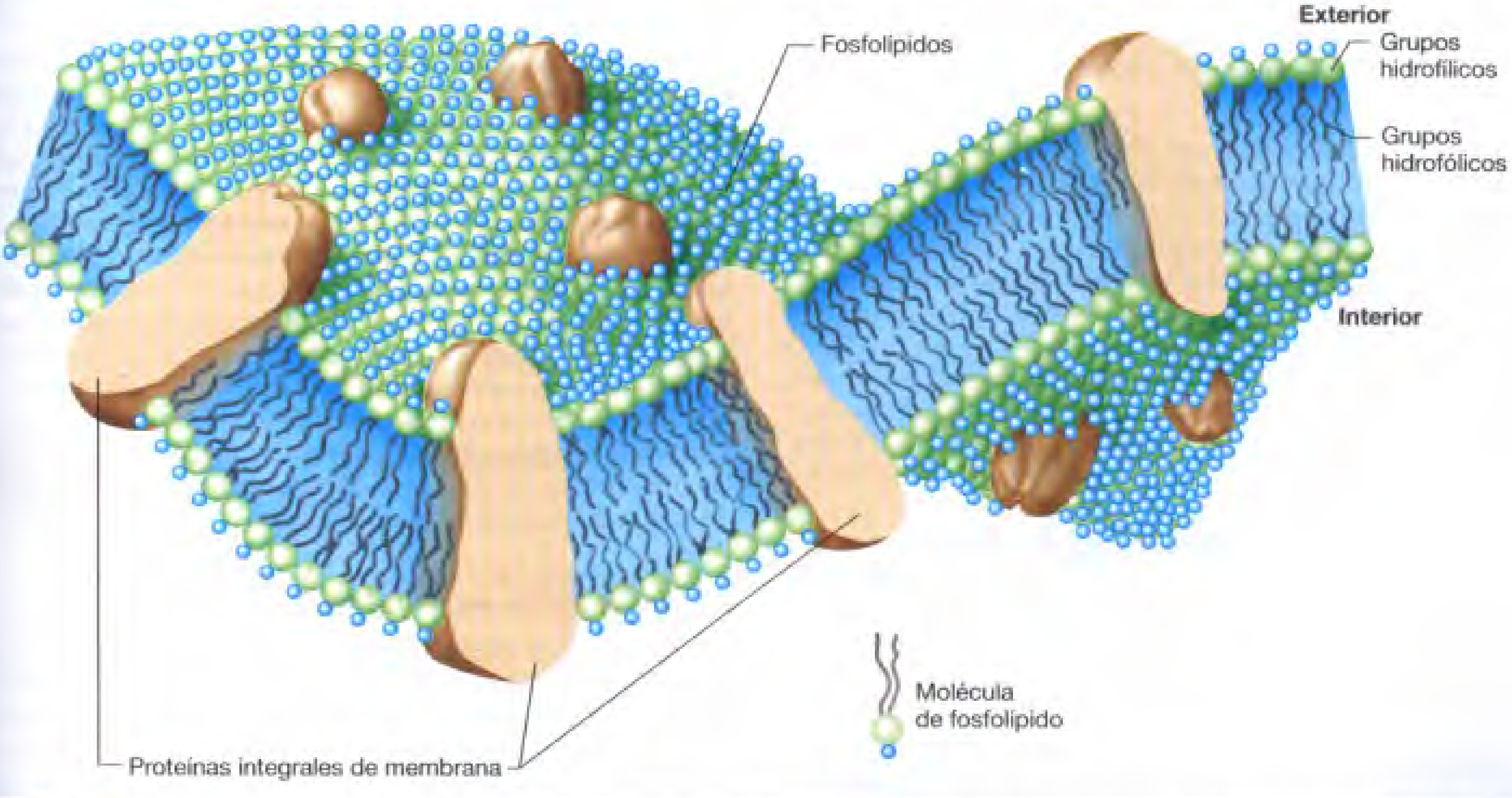

Fosfolípidos
Exterior
Grupos hidrofílicos
Grupos hidrofólicos
Interior
Molécula de fosfolípido
Proteínas integrales de membrana

Figura 4.17 Diagrama de la estructura de la membrana *citoplasmática;* la superficie interna se orienta hacia el citoplasma y la externa hacia el ambiente. La matriz de la unidad de membrana está compuesta de fosfolípidos, cuyos grupos hidrofóbicos están dirigidos hacia dentro mientras los grupos hidrofílicos se dirigen hacia fuera y se asocian con el agua. Las proteínas que están embebidas en la matriz tienen propiedades hidrofóbicas en la región que atraviesa la bicapa lipídica. Las proteínas hidrofílicas y otras sustancias cargadas, como los iones metálicos, pueden unirse a la superficie hidrofílica. Aunque existen algunas diferencias químicas, la estructura global de la membrana es similar tanto en procariotas como en eucariotas (no obstante, *véase* una excepción relativa al diseño de la bicapa en la Figura 4.20*d*).

Agentes que refuerzan las membranas: esteroles y hopanoides

Una de las diferencias más significativas entre las membranas de procariotas y eucariotas es que las de estos últimos poseen **esteroles** (Figura 4.18*a*, *b*). Los esteroles están ausentes de las membranas de casi todos los procariotas (las bacterias metanotrofas y los micoplasmas son las excepciones más notables, *véanse* Secciones 12.6 y 12.21). Dependiendo del tipo celular, los esteroles pueden suponer del 5 al 25% del total de los lípidos de membrana de los eucariotas. Los esteroles son moléculas rígidas y planas, mientras que los ácidos grasos son flexibles. La asociación de los esteroles con las membranas favorece su estabilización, pero las hace menos flexibles.

Los *hopanoides* son sustancias similares a los esteroles que están presentes en muchas especies del dominio *Bacteria* y es posible que desempeñen un papel parecido al de los esteroles en las membranas de los eucariotas. El hopanoide denominado *diplopteno* tiene 30 átomos de carbono y está ampliamente distribuido (Figura 4.18*c*). Hasta ahora no se han encontrado hopanoides en las especies del dominio *Archaea*.

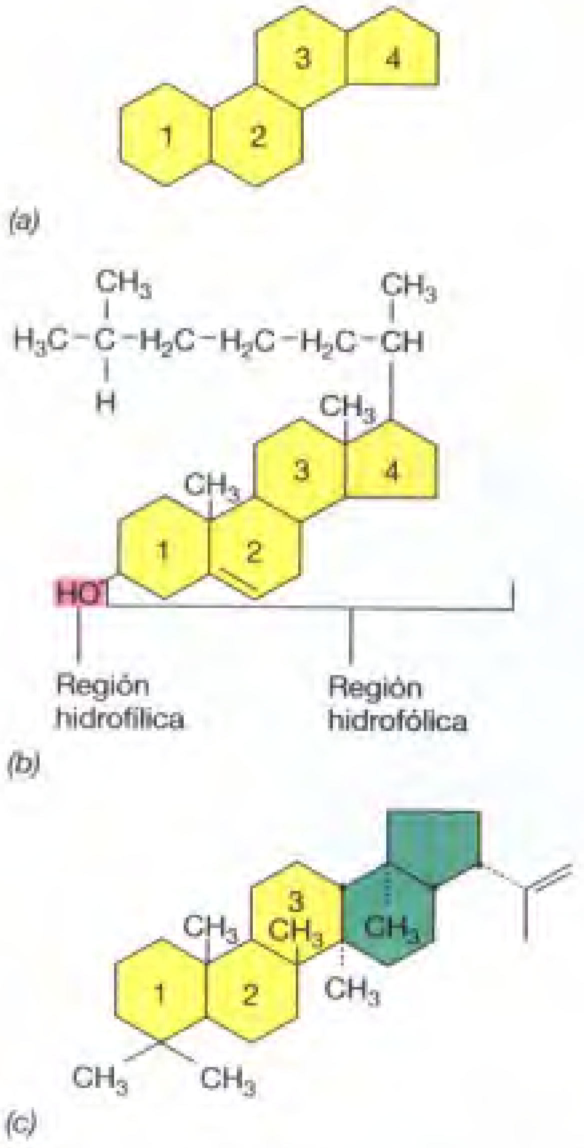


Figura 4.18 Esteroles y hopanoides. (a) Estructura general de un esterol. Todos los esteroles contienen los mismos cuatro anillos marcados como 1, 2, 3 y 4. (b) Estructura del colesterol. (c) Estructura del hopanoide diplopteno. Nótese la semejanza estructural con el colesterol en lo que se refiere a los anillos 1, 2 y 3. Los esteroles se encuentran en la membrana de los eucariotas y los hopanoides en las membranas de algunos procariotas.

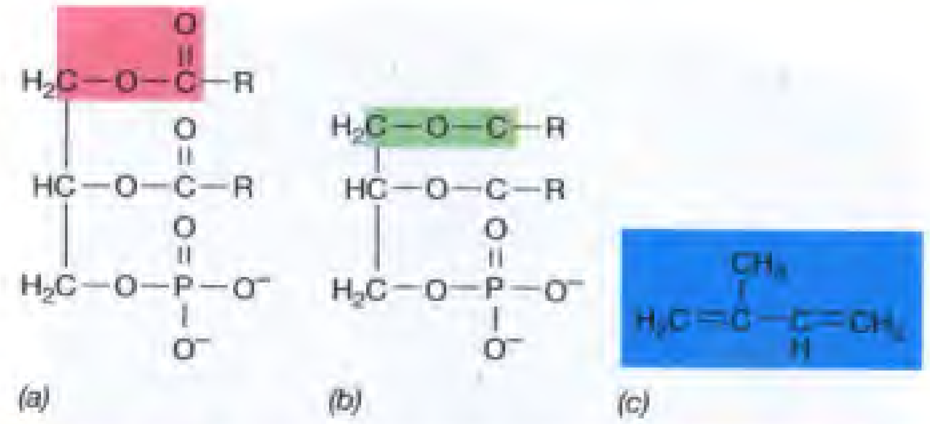


Figura 4.19 Enlaces químicos en lípidos. (a) El enlace *éster* se encuentra en los lípidos de *Bacteria* y *Eucaria*. (b) El enlace *éter* se encuentra en los lípidos de *Arquea*. (c) Isopreno, el precursor de las cadenas laterales hidrofóbicas (R) de los lípidos en las *Archaea*. Por el contrario, en los lípidos de las bacterias y de eucariotas, R son ácidos grasos.

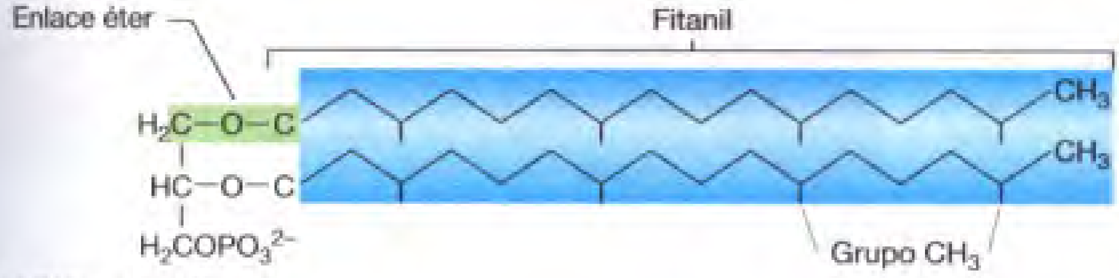
Membranas de *Archaea*

Los lípidos presentes en *Archaea* son únicos desde el punto de vista químico. A diferencia de lo que sucede en *Bacteria* o *Eukarya*, donde los enlaces *éster* son los responsables de la unión entre el glicerol y los ácidos grasos (*véanse* Figura 4.19*a* y Sección 3.4), los lípidos en *Archaea* poseen enlaces *éter* entre el glicerol y las cadenas laterales hidrofóbicas. Además, carecen de ácidos grasos y en su lugar tienen cadenas laterales compuestas de unidades repetitivas de *isopreno*, una molécula hidrocarbonada de 5 átomos de carbono (Figura 4.19*c*). Sin embargo, la estructura general de las membranas lipíticas de archaea se mantiene con superficies interna y externa hidrofílicas y con un interior hidrofóbico.

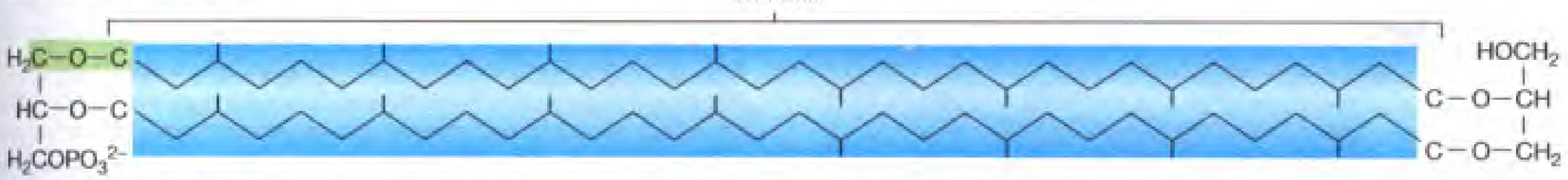
Los *diéteres* y *tetraéteres* de glicerol (Figura 4.20*a*, *b*) son los principales tipos de lípidos presentes en las *Archaea*. Las cadenas laterales de fitano (compuesto por cuatro unidades ligadas de isopreno) en las moléculas de un tetraéter se unen covalentemente entre sí (Figura 4.20*b*). Esto hace que se produzca una *monocapa* en vez de una bicapa lipídica (Figura 4.20*d*). Las monocapas lipídicas son bastante más estables y resistentes a la disgregación y, por tanto, no resulta extraño que este tipo de membrana sea la habitual entre las *Archaea* hipertermófilas, un tipo de procariotas que se desarrolla en ambientes con temperaturas muy altas (*véanse* Secciones 6.10 y 13.5-13.10). Existen otras características que distinguen los dominios *Bacteria* y *Archaea*, pero la composición lipídica de las membranas es una de las características más distintivas de cada uno de estos grupos filogenéticos.

✓ 4.5 Revisión de conceptos

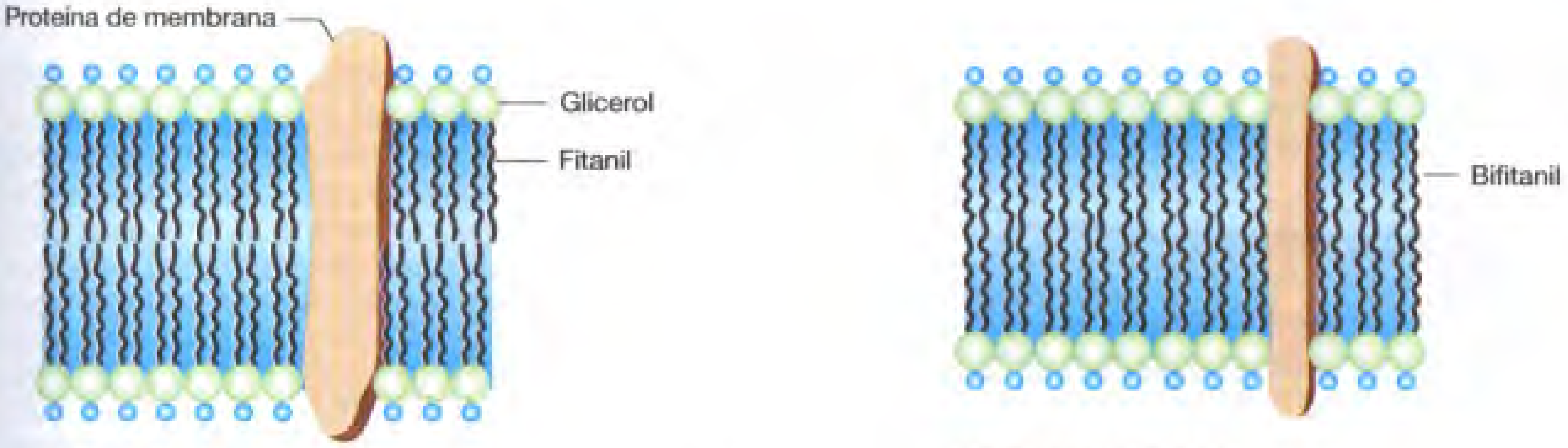
La membrana citoplasmática es una barrera con alta permeabilidad selectiva integrada por lípidos y proteínas que forman una bicapa donde los grupos polares se orientan hacia fuera y los grupos hidrofóbicos hacia el interior. Moléculas como los esteroles y los hopanoides pueden reforzar la estructura de las membranas, y existen proteínas integrales que atraviesan la membrana implicadas en procesos de transporte y otras funciones. A diferencia de lo que ocurre en *Bacteria* y *Eukarya*, en *Archaea* existen lípidos que contienen enlace éter, y algunas especies tienen membranas en monocapa en lugar de la bicapa habitual.



(a) **Diéter de glicerol**



(b) **Tetraéter de glicerol**



(c) **Bicapa lipídica** *(d)* **Monocapa lipídica**

Figura 4.20 Principales lípidos de *Archaea* y estructura de las membranas en las *Archaea*. (a) Diéteres de glicerol. (b) Tetraéteres de glicerol. En todos los casos la porción hidrocarbonada se une al glicerol por enlaces *éter*. En (a) la porción hidrocarbonada es fitano (C_{20}) y en (b) es bifitano (C_{40}). (c, d) Estructura de membrana presente en *Archaea*. (c) Bicapa lipídica. (d) Monocapa lipídica.

- ✓ Dibuje un esquema con la estructura básica de una bicapa lipídica
- ✓ ¿Por qué compuestos como los esteroles y hopanoides son tan eficientes en la estabilización de la membrana citoplasmática?
- ✓ Compare el tipo de unión que existe entre el glicerol y la porción hidrofóbica en los lípidos de *Bacteria* y de *Archaea*.

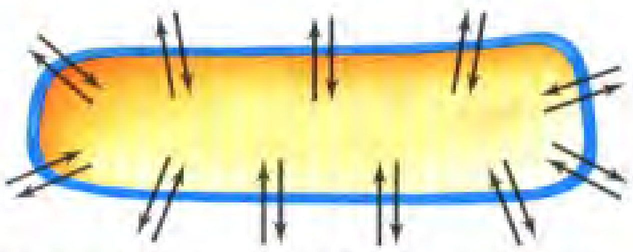
4.6 Función de la membrana citoplasmática

La membrana citoplasmática es algo más que una simple barrera que separa el interior y el exterior celular. Esta membrana lleva a cabo funciones celulares muy importantes. Por una parte funciona como una *barrera de permeabilidad*, evitando la pérdida pasiva de componentes del citoplasma y la entrada indiscriminada de constituyentes (Figura 4.21). Además, la membrana es el lugar donde se asientan muchas proteínas, muchas de las cuales son enzimas o están implicadas de una u otra manera en el transporte de sustancias hacia el interior y hacia el exterior de la célula.

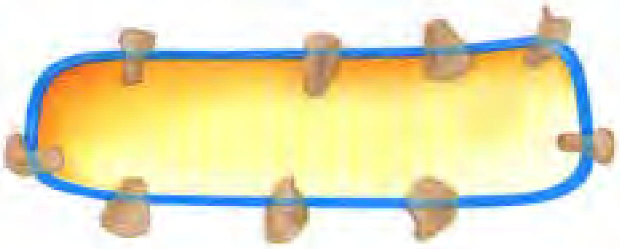
En el Capítulo 5, aprenderemos que la membrana citoplasmática también es el sitio donde se produce la energía en la célula. La membrana puede estar en una forma energéticamente «cargada», en la que existe una separación de los protones (H^+) y de los iones hidroxilo (OH^-) a través de su superficie (Figura 4.21). Esta separación de carga es una forma de energía, similar a la energía potencial presente en una batería cargada. Este estado energético de la membrana, que se conoce como *fuerza motriz de protones* (PMF, en inglés *proton-motive force*), es el responsable del mantenimiento de muchas funciones celulares que requieren energía, tales como algunas formas de transporte, la movilidad y la biosíntesis de la «moneda energética» de la célula, es decir, el ATP (Figura 4.21).

La membrana citoplasmática como barrera de permeabilidad

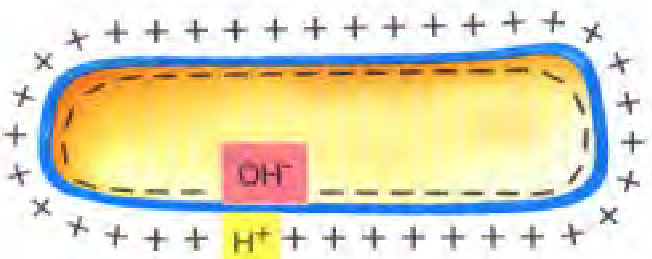
El interior de la célula (el citoplasma) contiene una solución en fase acuosa de sales, azúcares, aminoácidos, vitaminas, coenzimas y una gran variedad de otras sustancias solubles. Las características hidrofóbicas de la membrana le permiten funcionar como una barrera estricta. Aunque algunas pequeñas moléculas hidrofóbicas pueden pasar la membrana por difusión, las moléculas hidrofílicas y cargadas no la atraviesan y deben ser transportadas de modo específico. Incluso, una sustancia tan pequeña como el ion de hidrógeno (H^+) no es capaz de pasar la membrana citoplasmática por difusión. Una molécula que atraviesa la membrana es el agua, que es lo suficientemente pequeña



Barrera de permeabilidad — Evita pérdidas y funciona como puerta de entrada y salida de nutrientes



Anclaje de proteínas — Lugar de situación de muchas proteínas implicadas en transporte, bioenergética y quimiotaxis



Conservación de energía — Sitio de generación y uso de la fuerza motriz de protones

Figura 4.21 Principales funciones de la membrana *citoplasmática.*

como para pasar entre las moléculas de fosfolípidos. Sin embargo, el transporte del agua a través de la membrana puede acelerarse mediante proteínas de transporte llamadas *aquaporinas*. Estas proteínas, presentes en todos los organismos, forman canales transmembranales que transportan específicamente el agua al interior y al exterior del citoplasma. Por ejemplo, la aquaporina AqpZ de *Escherichia coli* es una proteína que no resulta esencial y cuya síntesis se induce en condiciones de baja presión osmótica. Parece probable que AqpZ funcione como un *exportador* de agua más que como un *importador*, evitando que la célula sufra un choque hipo-osmótico.

La permeabilidad relativa de una serie de sustancias con importancia biológica se muestra en la Tabla 4.1. Como puede verse, la mayoría de las sustancias no son capaces de entrar en la célula de modo pasivo, por lo que los procesos de *transporte* resultan esenciales para el funcionamiento celular. Los datos de la Tabla 4.1 deberían considerarse teniendo en cuenta que el flujo del agua en las células procarióticas puede ser facilitado por las aquaporinas y no se debe solamente a su difusión a través de la membrana.

TABLA 4.1 Permeabilidad comparada de las membranas a diferentes solutos

Sustancia	Porcentaje de permeabilidad[a]
Agua	100
Glicerol	0,1
Triptófano	0,001
Glucosa	0,001
Ion cloruro (Cl^-)	0,000001
Ion potasio (K^+)	0,0000001
Ion sodio (Na^+)	0,00000001

[a] Escala relativa: permeabilidad en relación con la permeabilidad del agua a la que asigna el 100%. La permeabilidad de la membrana al agua puede verse afectada por la acción de las aquaporinas (*véase* texto).

Necesidad de proteínas transportadoras

Las proteínas de transporte hacen algo más que transportar sustancias a través de la membrana: son capaces de acumular solutos dentro de la célula *en contra* de un gradiente de concentración. La necesidad de un transporte mediado por transportadores en los microorganismos es fácil de entender. Si los solutos entraran en la célula únicamente por difusión, en las células nunca se alcanzaría la concentración intracelular necesaria para que las reacciones bioquímicas tengan lugar. Este proceso se debe a que tanto la velocidad de entrada como el nivel intracelular de los solutos difusibles es proporcional a su concentración externa (Figura 4.22). Sin embargo, a menudo la concentración de nutrientes en condiciones naturales es muy baja. Por tanto, la célula debe poseer mecanismos para acumular nutrientes a concentraciones superiores a las encontradas en la naturaleza y ésta es precisamente la función de los transportadores. Además, a diferencia del transporte por difusión simple, el transporte mediado por transportadores muestra un *efecto de saturación*: si la concentración de sustrato es lo suficientemente alta como para saturar el transportador disponible, lo que ocurre a menudo incluso a concentraciones relativamente bajas de sustrato, la velocidad de transporte es máxima y la adición de más sustrato no puede aumentar la velocidad (Figura 4.22).

Una característica importante del transporte mediado por transportadores es la naturaleza *altamente específica* de

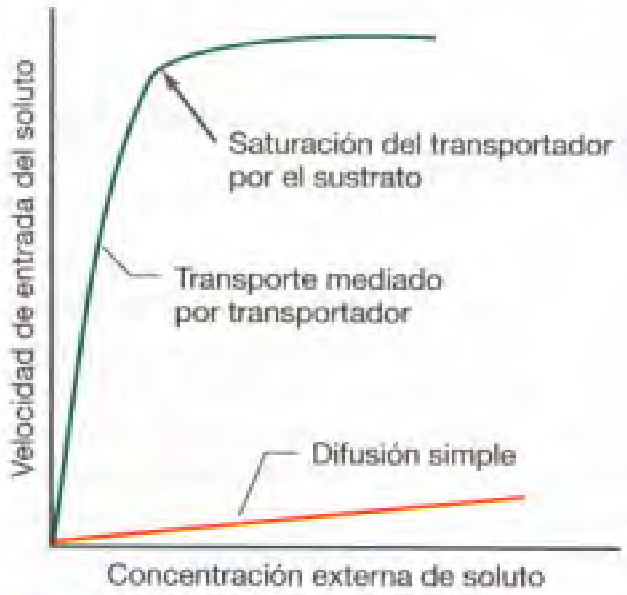


Figura 4.22 Relación entre la velocidad de captación y la concentración externa en procesos de difusión y transporte. Nótese que en el proceso en el que interviene un transportador la captación alcanza saturación a concentraciones externas relativamente bajas.

este proceso. Muchas proteínas transportadoras reaccionan solamente con un tipo único de molécula, mientras que otras muestran distintas afinidades para una clase química determinada de moléculas. Por ejemplo, hay transportadores que transportan azúcares o aminoácidos relacionados. Esta economía funcional reduce la necesidad de proteínas de transporte diferentes para cada aminoácido o azúcar que la célula necesita transportar. Además, la célula *regula* la síntesis de proteínas de transporte de tal modo que el equipamiento específico de transportadores presentes en la membrana está en función de los nutrientes que están en el medio y de su concentración. Esto último es importante porque a veces el transportador para un determinado nutriente es de un tipo cuando éste está presente a una concentración elevada, y de otro tipo de mayor afinidad cuando está a una concentación más baja.

✓ 4.6 Revisión de conceptos

La función principal de la membrana citoplasmática es la de actuar como barrera de permeabilidad para evitar la pérdida de metabolitos del citoplasma al medio externo. La permeabilidad selectiva también evita la difusión de muchos solutos. Para la acumulación de sustancias en contra de un gradiente de concentración se emplean mecanismos de transporte específico.

- ✓ Además de la permeabilidad, ¿qué otras funciones lleva a cabo la membrana citoplasmática?
- ✓ Señale dos razones por las que una célula no puede depender sólo de la difusión para incorporar nutrientes dentro de ella.
- ✓ ¿Por qué el daño físico a la membrana es un problema más importante que el daño en otros componentes celulares?

4.7 Sistemas de transporte de membrana

Como se ha señalado, el transporte de nutrientes y la expulsión de sustancias de desecho son procesos clave en la vida de la célula. En los procariotas se han desarrollado diversos sistemas de transporte, cada uno con características peculiares únicas. Expondremos aquí las principales clases de transporte.

Estructura y función de las proteínas transportadoras de membrana

Existen al menos tres clases de sistemas de transporte, aquellos que implican solamente una proteína transmembranal, aquellos que comprenden una proteína transmembranal más un componente periplásmico de unión y, finalmente, aquellos que, como el sistema fosfotransferasa, implican una serie de proteínas que cooperan en el proceso del transporte (Figura 4.23). Todos estos sistemas requieren energía, bien sea en forma de fuerza motriz de protones, de ATP, o de algún otro compuesto de alta energía.

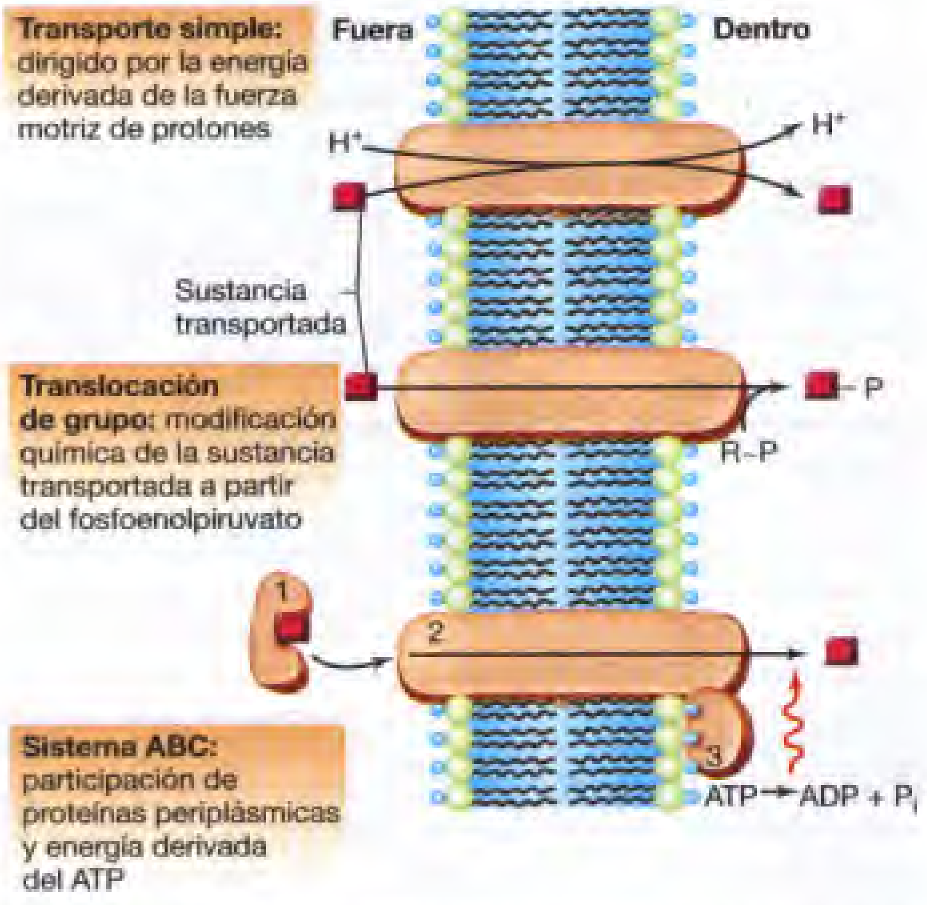

Transporte simple: dirigido por la energía derivada de la fuerza motriz de protones
Fuera
Dentro
H^+
H^+
Sustancia transportada
Translocación de grupo: modificación química de la sustancia transportada a partir del fosfoenolpiruvato
P
R–P
1
2
3
Sistema ABC: participación de proteínas periplásmicas y energía derivada del ATP
ATP
ADP + P_i

Figura 4.23 Las tres clases de sistemas de transporte de membrana. Nótese que el transporte simple y el sistema ABC transportan sustancias sin modificarlas químicamente, mientras que la translocación de grupo ocasiona la modificación química (fosforilación) de la sustancia transportada.

Las proteínas transmembranales de prácticamente todos los sistemas de transporte bacterianos presentan una homología significativa en su estructura primaria y secundaria, lo que refleja sus raíces evolutivas comunes. Desde el punto de vista estructural, estos transportadores presentan a menudo 12 hélices de tipo alfa (*véase* Sección 3.7) que se pliegan hacia atrás y hacia delante a través de la membrana formando un canal que permite el transporte de una sustancia al interior de la célula (Figura 4.24). El transporte se lleva a cabo por un cambio conformacional de la proteína tras la unión del sustrato específico, haciendo que el compuesto pase a través de la membrana.

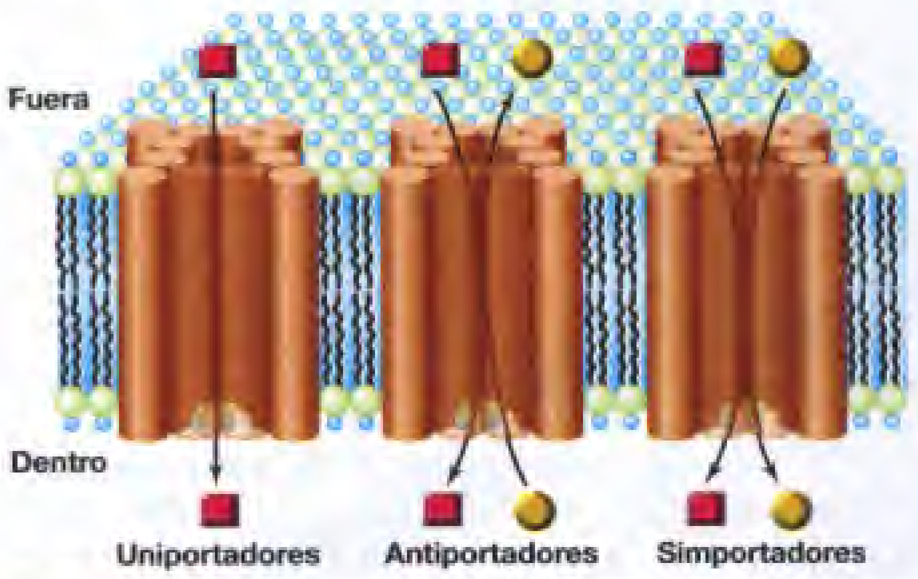


Figura 4.24 Estructura de los transportadores transmembranales y tipos de procesos de transporte. En los procariotas, los transportadores transmembranales contienen por lo general 12 moléculas proteicas alineadas en círculo formando un canal a través de la membrana. Aquí se presentan 3 transportadores individuales que muestran sólo 4 de las 12 proteínas, y cada uno de los cuales lleva a cabo un tipo diferente de transporte. En los casos de transporte de tipo antiporte y simporte, la molécula co-transportada se indica en amarillo.

Los diferentes *tipos* de mecanismos de transporte que pueden ocurrir se resumen en la Tabla 4.24. Los sistemas *uniportadores* son proteínas que transportan una molécula en un solo sentido a través de la membrana. Los *simportadores* son proteínas que transportan una sustancia *junto con* otra, frecuentemente un protón (H^+). Los *antiportadores* incluyen proteínas que transportan una sustancia en un sentido mientras que simultáneamente transportan otra en sentido *opuesto* (Figura 4.24).

Las permeasas Lac: ejemplo de transportador simple

La bacteria *Escherichia coli* puede crecer utilizando el disacárido lactosa. Las células de *E. coli* incorporan la lactosa mediante un simportador llamado permeasa Lac. La permeasa Lac es un ejemplo típico de un simportador porque toma una molécula de lactosa junto con un protón. Esto se indica en la Figura 4.25, donde se compara la actividad de la permeasa con otros transportadores simples de tipo uniportador y antiportador. Por cada molécula de lactosa que se transporta al interior mediante la permeasa Lac, la energía de la fuerza motriz de protones disminuye debido al flujo de protones al interior celular. No obstante, la fuerza motriz de protones se restablece continuamente en la célula gracias a las reacciones que suministran energía y que describiremos en capítulos siguientes (*véanse* Capítulos 5 y 17). El resultado final de la acción de un transportador simple como la permeasa Lac es la acumulación de un soluto, en este caso lactosa, hasta concentraciones lo suficientemente altas como para que su metabolismo proporcione a su vez energía a la célula.

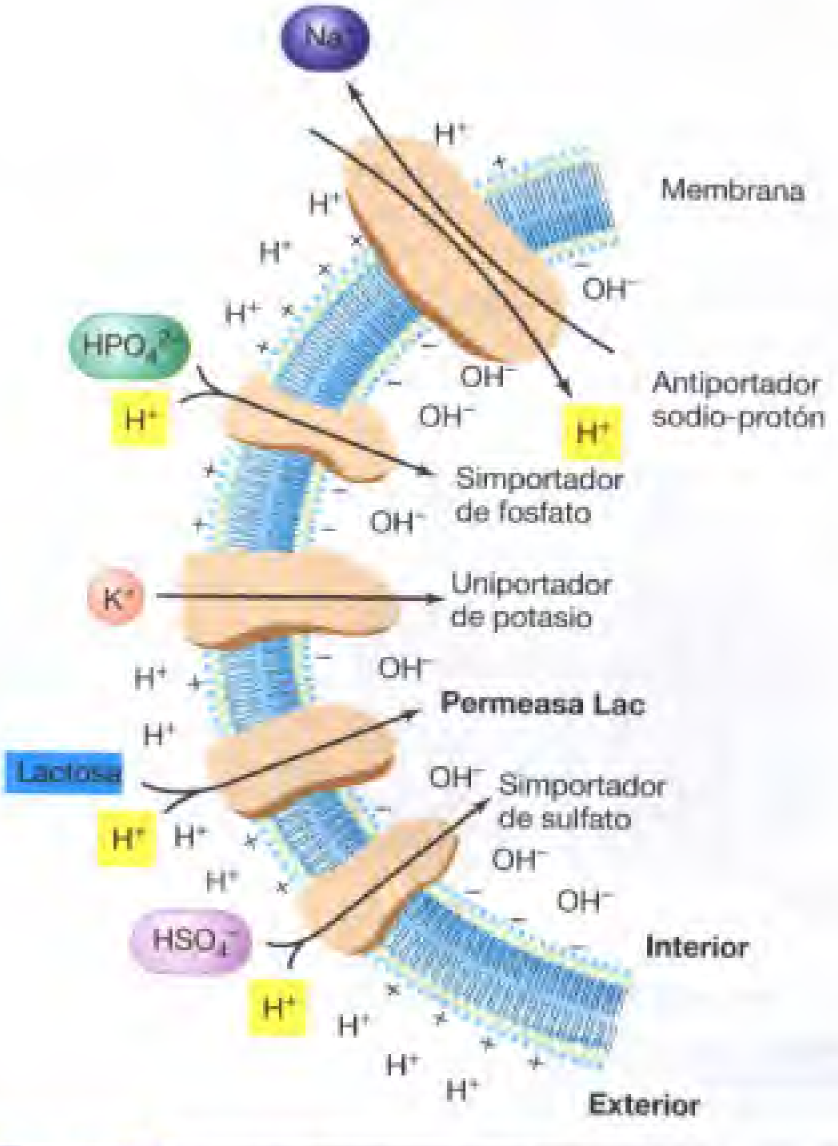


Figura 4.25 Función de la permeasa Lac de *Escherichia coli* (un simportador) y de otros transportadores simples bien caracterizados. Aunque las proteínas transmembranales se representan aquí de forma globular por simplicidad, su estructura es realmente la indicada en la Figura 4.24.

Translocación de grupo

La **translocación de grupo** es un tipo de transporte en el que la sustancia transportada resulta *químicamente modificada* durante su paso a través de la membrana. Los casos mejor estudiados de este tipo de transporte son los que se refieren al transporte de los azúcares glucosa, manosa y fructosa, que son *fosforilados* durante el proceso de transporte por el **sistema de la fosfotransferasa**.

En *Escherichia coli*, el sistema de la fosfotransferasa está formado por una familia de proteínas, de las que al menos cuatro son necesarias para llevar a cabo el transporte de un azúcar determinado. Antes de que el azúcar se transporte al interior celular, las proteínas mismas del sistema fosfotransferasa se fosforilan y defosforilan a modo de cascada hasta que la proteína transmembranal denominada Enzima II_c recibe el grupo fosfato y fosforila el azúcar transportado (Figura 4.26). Una proteína pequeña llamada HPr, la enzima que la fosforila (Enzima I), y la Enzima II_a son proteínas citoplásmicas, mientras que la Enzima II_b está situada en la superficie interna de la membrana y la Enzima II_c es una proteína integral de la membrana (Figura 4.26). Tanto HPr como la Enzima I son componentes inespecíficos del sistema fosfotransferasa y participan en el transporte de varios azúcares en cambio; existen Enzimas II que son específicas para cada azúcar individual.

El enlace fosfato de alta energía que suministra la energía requerida por el sistema fosfotransferasa deriva de un metabolito intermediario clave denominado *fosfoenol piruvato*. No obstante, debe apreciarse que aunque en el proceso de transporte de una molécula de glucosa se consume energía en la forma de un enlace fosfato de alta energía (Figura 4.26), la fosforilación de glucosa a glucosa-6-P es el primer paso necesario para su posterior metabolismo intracelular (*véase* Sección 5.10). Por tanto, el sistema fosfotransferasa prepara la glucosa transportada para su entrada inmediata en las rutas metabólicas centrales.

Transporte dependiente de proteínas periplásmicas de unión: el sistema «ABC»

Veremos más adelante en este capítulo (*véase* Sección 4.9) que las bacterias Gram negativas presentan un espacio llamado *periplasma* entre la membrana citoplasmática y una membrana externa rica en lípidos (*véase* Figura 4.36). El periplasma contiene diversas proteínas, muchas de las cuales funcionan en sistemas de transporte y se denominan *proteínas periplásmicas de unión*. Los sistemas de transporte que utilizan proteínas periplásmicas de unión también poseen componentes proteicos transmembranales, que son los que realmente llevan a cabo el proceso de transporte; y

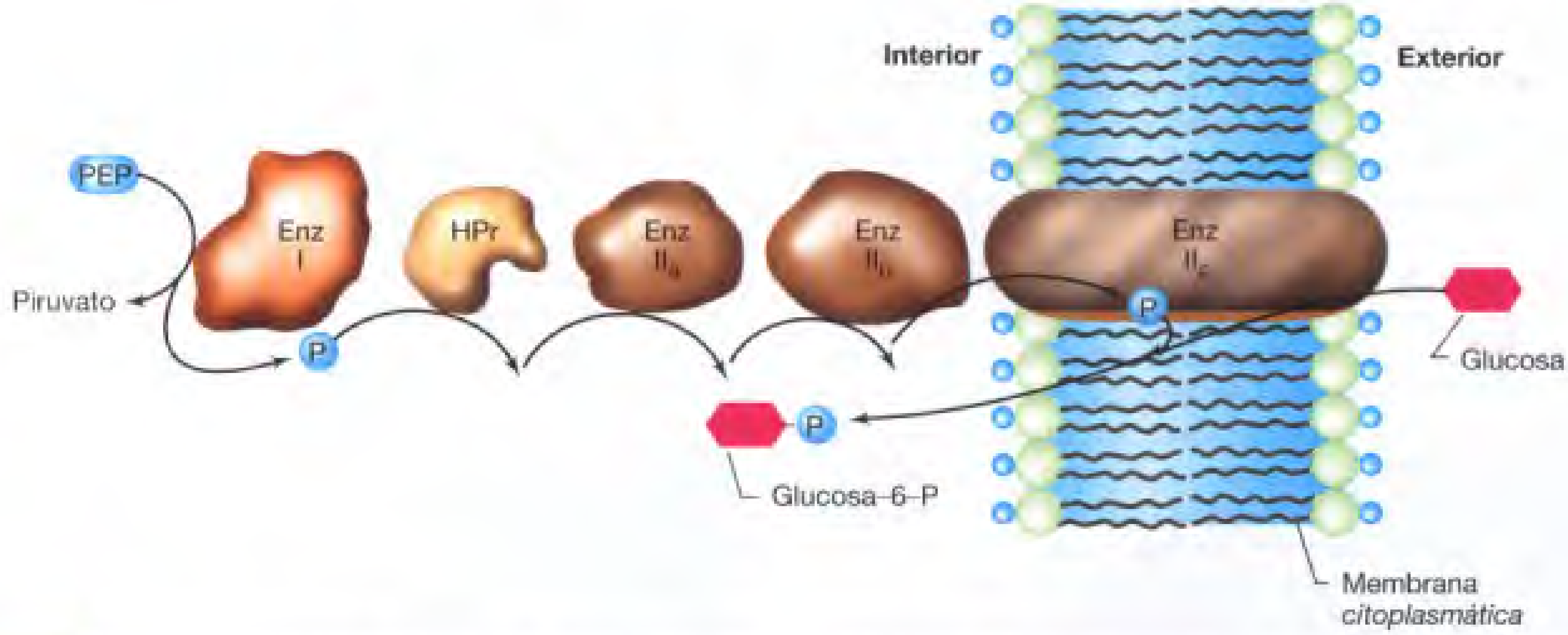


Figura 4.26 Mecanismo de acción del sistema fosfotransferasa de *Escherichia coli*. Para el transporte de glucosa, el sistema consta de cinco proteínas: Enzima (Enz) I, Enzimas II_a, II_b y II_c, y HPr. La transferencia secuencial de fosfato tiene lugar desde el fosfoenolpiruvato (PEP), a través de las proteínas que se indican, hasta la Enzima II_c. Esta última es la auténtica responsable del transporte (y fosforilación) del azúcar.

un tercer componente que suministra la energía necesaria para el proceso mediante hidrólisis de ATP. Estos tipos de transporte se denominan **sistemas de transporte ABC** (derivado del inglés *A*TP-*b*inding *c*asette). El mecanismo de acción de un transporte de tipo ABC se indica en la Figura 4.27.

En procariotas se han identificado más de 200 sistemas diferentes de transporte ABC, y en cada caso los análisis de la estructura de los componentes relacionados funcionalmente ponen de manifiesto que forman una *familia* de proteínas homólogas. Una interesante propiedad de estos sistemas de transporte es la elevada afinidad de las proteínas periplásmicas de unión por los respectivos sustratos. Estas proteínas se mueven por el periplasma y son capaces de unir sus sustratos incluso cuando éstos están presentes a muy bajas concentraciones; por ejemplo, unen y transportan con facilidad sustratos a concentraciones tan bajas como 1 micromolar (10^{-6} M). Tras la unión del sustrato a la proteína correspondiente, el complejo interacciona con el componente transmembranal respectivo y tiene lugar el verdadero transporte, gracias a la energía liberada por la hidrólisis del ATP (Figura 4.27). Es interesante señalar que aunque las bacterias Gram positivas carecen de periplasma, también están presentes en muchos de estos organismos sistemas de transporte dependientes de proteínas de unión, pero éstas proteínas no son móviles sino que se presentan ancladas en la membrana citoplasmática. Como en el caso de las bacterias Gram negativas, una vez que ocurre la unión con el sustrato, las proteínas de unión interaccionan con los elementos transmembranales y tiene lugar el transporte a través de la membrana a expensas del gasto de ATP.

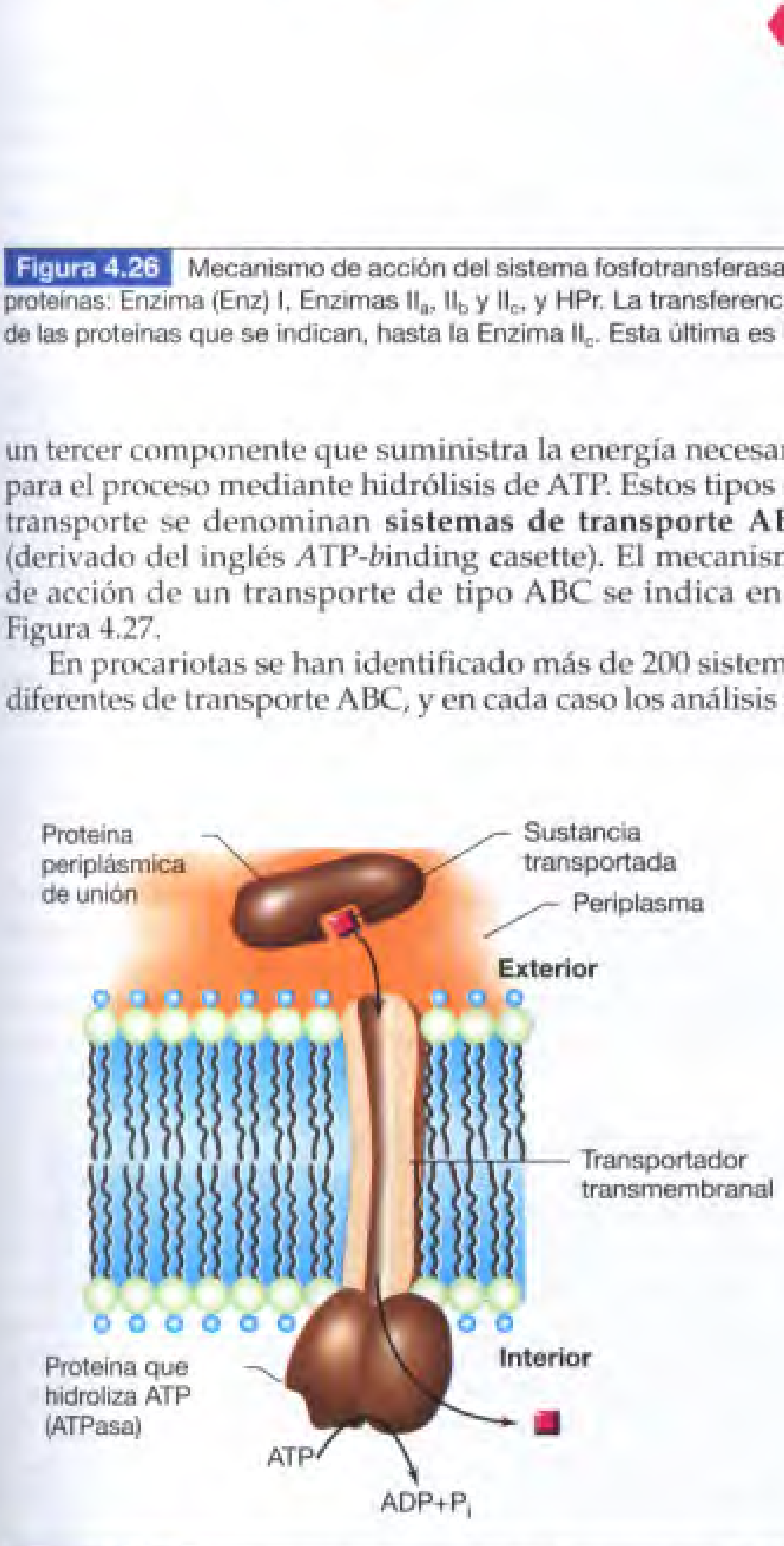

Proteína periplásmica de unión
Sustancia transportada
Periplasma
Exterior
Transportador transmembranal
Interior
Proteína que hidroliza ATP (ATPasa)
ATP
ADP+P$_i$

Figura 4.27 Mecanismo de acción de un transportador de tipo ABC. La proteína periplásmica de unión tiene una elevada afinidad por el sustrato, la proteína transmembranal forma el canal de transporte, y la proteína *citoplasmica* que hidroliza el ATP suministra la energía requerida para el proceso. En *Escherichia coli*, la maltosa (un disacárido) es transportada por un sistema de tipo ABC.

Transporte de proteínas al exterior

Hasta ahora hemos considerado el transporte de moléculas pequeñas. ¿Cómo se realiza el transporte de moléculas grandes, como las proteínas? Para su correcto funcionamiento, muchas proteínas necesitan ser transportadas fuera de la unidad de membrana o insertarse de modo específico en dicha membrana. En las células procarióticas, la translocación de proteínas se realiza mediante la actividad de proteínas llamadas *translocasas*; una de las más importantes es el sistema Sec (de sistema de secreción). La translocasa SecYEG es una proteína que está asociada a la membrana con una orientación específica adecuada a su función. Algunas translocasas son altamente específicas en su modo de acción pero SecYEG, en concreto, está ampliamente distribuida entre los procariotas y es capaz de traslocar muchas proteínas diferentes. El mecanismo por el que se renonoce a las proteínas destinadas a ser transportadas es una cuestión que será tratada en un capítulo posterior (*véase* Sección 7.16).

El transporte de proteínas al exterior es muy importante para las bacterias porque muchas enzimas funcionan precisamente fuera de la célula. Por ejemplo, muchas enzimas hidrolíticas como las amilasas o celulasas, se exportan directamente al exterior donde rompen el almidón o la celulosa para producir glucosa, que puede ser utilizada luego por la célula como fuente de carbono y energía. Además, muchas bacterias patógenas producen toxinas proteicas y otras proteínas perjudiciales durante la infección. Todas estas moléculas grandes necesitan salir de la célula atravesando la membrana citoplasmática y las traslocasas del tipo de SecYEG median estos fenómenos de transporte.

✓ 4.7 Revisión de conceptos

Existen al menos tres tipos de transportadores: los simples, los de tipo fosfotransferasa, y los sistemas ABC que contienen tres elementos. El transporte requiere energía procedente de la fuerza motriz de protones o del ATP.

- ✓ Compare los requerimientos de energía de los transportadores simples, del sistema fosfotransferasa y del sistema de transporte de tipo ABC.
- ✓ Compare los tres tipos de transporte antes mencionados en lo que se refiere a las alteraciones químicas que tienen lugar en la molécula transportada.
- ✓ Indique qué sistema de transporte es el más adecuado para nutrientes que se encuentran en el medio externo a concentraciones extremadamente bajas y comente la razón.
- ✓ ¿Cómo salen las proteínas de la célula?

4.8 La pared celular de los procariotas: peptidoglicano y moléculas relacionadas

Debido a la concentración de solutos disueltos dentro de una célula bacteriana se desarrolla una considerable presión de turgencia que, en una célula como *Escherichia coli*, se calcula en unas 2 atmósferas; ésta es una presión similar a la de un neumático de coche. Para resistir esta presión, las bacterias poseen **paredes celulares**, que además son las responsables de la forma y rigidez de la célula. La pared celular no se observa fácilmente con el microscopio óptico, pero se visualiza con claridad en cortes finos con el microscopio electrónico de transmisión.

Las bacterias se dividen en dos grandes grupos: las **Gram positivas** y las **Gram negativas**. La distinción inicial entre estos dos tipos se llevó a cabo mediante una tinción diferencial denominada *tinción de Gram* (*véase* Sección 4.1); pero la diferente reacción a la tinción de Gram se basa en las diferencias que existen en la estructura de las paredes celulares. La morfología de las paredes celulares es muy distinta en las células Gram positivas y Gram negativas, como se observa en la Figura 4.28. La pared celular en las Gram negativas está compuesta por varias capas y es bastante compleja, mientras que la pared en las Gram positivas está formada fundamentalmente por un solo tipo de molécula y suele ser más ancha. Un examen detallado mediante microsocopía electrónica de barrido permite detectar diferencias claras en la textura de la superficie de los dos tipos de paredes celulares (Figura 4.28).

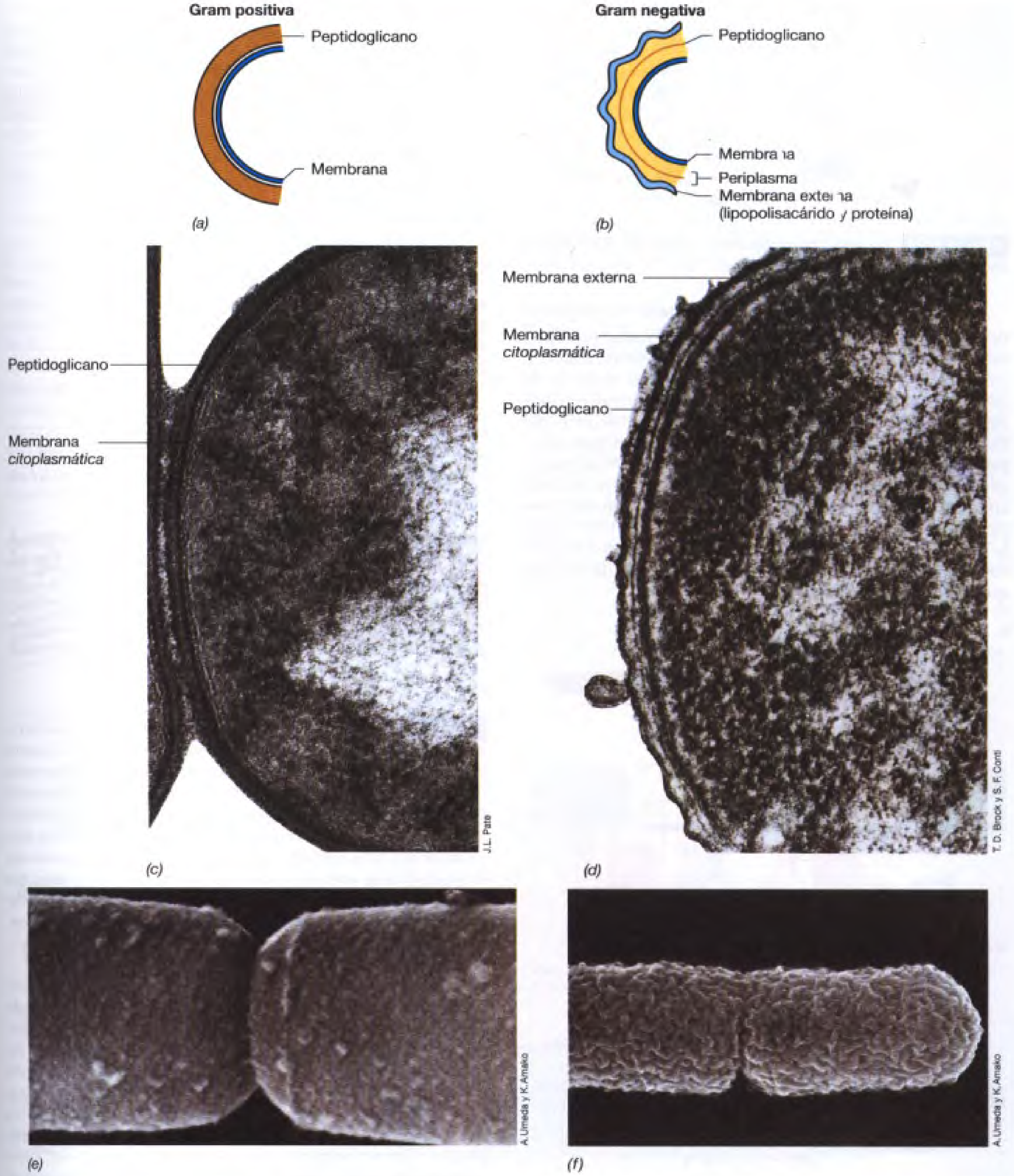
En esta sección, nos centraremos en los componentes polisacarídicos de las paredes celulares de los procariotas, tanto *Bacteria* como *Archaea*. Se estudiará en particular el peptidoglicano, pero también otros polisacáridos relacionados y no relacionados que se encuentran en *Archaea*. En la Sección 4.9, se describen otros componentes de la pared celular que se encuentran en *Bacteria* Gram negativas.

Peptidoglicano

En la pared celular de *Bacteria* hay una capa rígida que es la responsable de la resistencia de la pared celular. En *Bacteria* Gram negativas existen capas adicionales que se sitúan en el exterior de ésta. Esta capa rígida tiene una composición química muy similar tanto en *Bacteria* Gram positivas como en Gram negativas. Se denomina capa de **peptidoglicano** (o **mureína**) y está formada por finas láminas compuestas por dos derivados de azúcares, *N-acetilglucosamina* y *ácido N-acetilmurámico*, y un pequeño grupo de aminoácidos que incluyen L-alanina, D-alanina, D-glutámico y o bien lisina o ácido diaminopimélico (DAP) (Figura 4.29). Estos componentes se unen entre sí para formar una estructura repetitiva que se denomina *tetrapéptido del glicano* (Figura 4.30).

La estructura básica del peptidoglicano está constituida por una lámina en la que las cadenas de derivados de azúcares se conectan entre sí por puentes peptídicos a través de los aminoácidos. Los enlaces glicosídicos que unen los azúcares en las cadenas son muy fuertes, pero las cadenas por sí solas no pueden conferir rigidez en todas las direcciones. Cuando las cadenas se entrecruzan mediante puentes peptídicos se logra la rigidez característica de la pared. El número de puentes peptídicos no es igual en todas las especies de *Bacteria* y las paredes más rígidas son aquellas que presentan mayor número de puentes intercatenarios. En *Bacteria* Gram negativas, los puentes se establecen, por lo general, mediante enlace peptídico directo del grupo amino del diaminopimélico al grupo carboxilo de la D-alanina terminal (Figura 4.31*a*). En *Bacteria* Gram positivas, el enlace se establece con frecuencia a modo de puente interpeptídico mediante varios aminoácidos, cuyo número y tipo depende de los distintos organismos. En *Staphylococcus aureus*, una de las bacterias Gram positivas mejor conocidas, cada puente está formado por cinco glicinas conectadas por enlaces peptídicos (Figura 4.31*b*). La estructura global de la molécula del peptidoglicano se muestra en la Figura 4.31*c*.

En *Bacteria* Gram positivas, el peptidoglicano representa hasta el 90% de la pared, aunque otra clase de compo-


Gram positiva
Peptidoglicano
Membrana
(a)
Gram negativa
Peptidoglicano
Membrana
Periplasma
Membrana externa
(lipopolisacárido y proteína)
(b)
Peptidoglicano
Membrana citoplasmática
(c)
Membrana externa
Membrana citoplasmática
Peptidoglicano
(d)
(e)
(f)

J.L. Pate

T. D. Brock y S. F. Conti

A.Umeda y K.Amako

A.Umeda y K.Amako

Figura 4.28 Paredes celulares de *Bacteria*. (a,b) Diagramas esquemáticos de paredes celulares Gram positivas y Gram negativas. (c) Micrografía electrónica de la pared de una bacteria Gram positiva, *Arthrobacter crystallopoietes*. (d) Bacteria Gram negativa, *Leucothrix mucor*. (e,f) Micrografías electrónicas de barrido de bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis*) y Gram negativas (*Escherichia coli*). Obsérvese la diferente textura superficial en las células mostradas en (e) y (f). Una célula de *B. subtilis* o de *E. coli* tiene un diámetro aproximado de 1 μm.

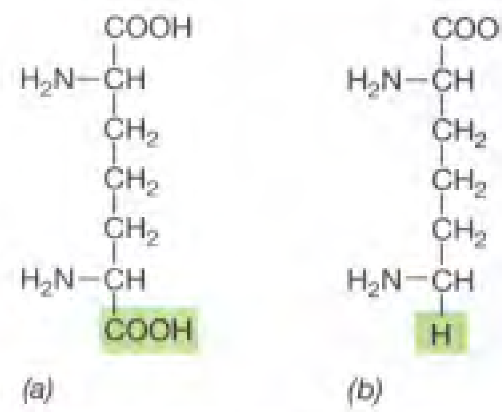

COOH
H_2N–CH
CH_2
CH_2
CH_2
H_2N–CH
COOH
(a)
COOH
H_2N–CH
CH_2
CH_2
CH_2
H_2N–CH
H
(b)

Figura 4.29 (a) Ácido diaminopimélico. (b) Lisina. Se resalta la única diferencia entre las dos moléculas.

nentes, los ácidos teicoicos, también suelen estar presentes en pequeñas cantidades (*véase* más adelante en esta sección). Aunque algunas bacterias poseen sólo una capa de peptidoglicano rodeando a la célula, muchas otras, en especial las *Bacteria* Gram positivas, presentan varias capas (hasta 25 en algunos casos). En *Bacteria* Gram negativas, el peptidoglicano constituye sólo alrededor del 10% de pared, estando constituido el resto por una membrana externa como se verá en la Sección 4.9. Sin embargo, tanto en Gram positivas como en Gram negativas se cree que la forma de la bacteria viene determinada por la longitud de las cadenas de peptidoglicano y por el número y tipo de puentes establecidos entre las cadenas.

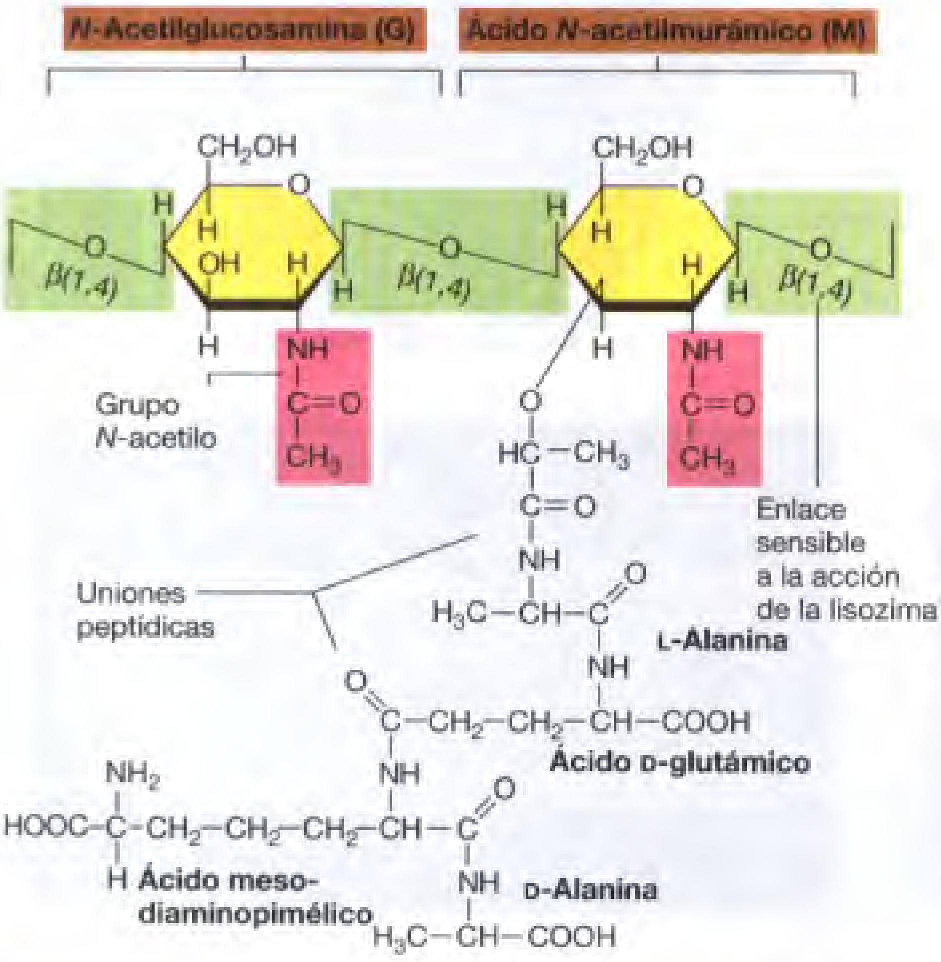
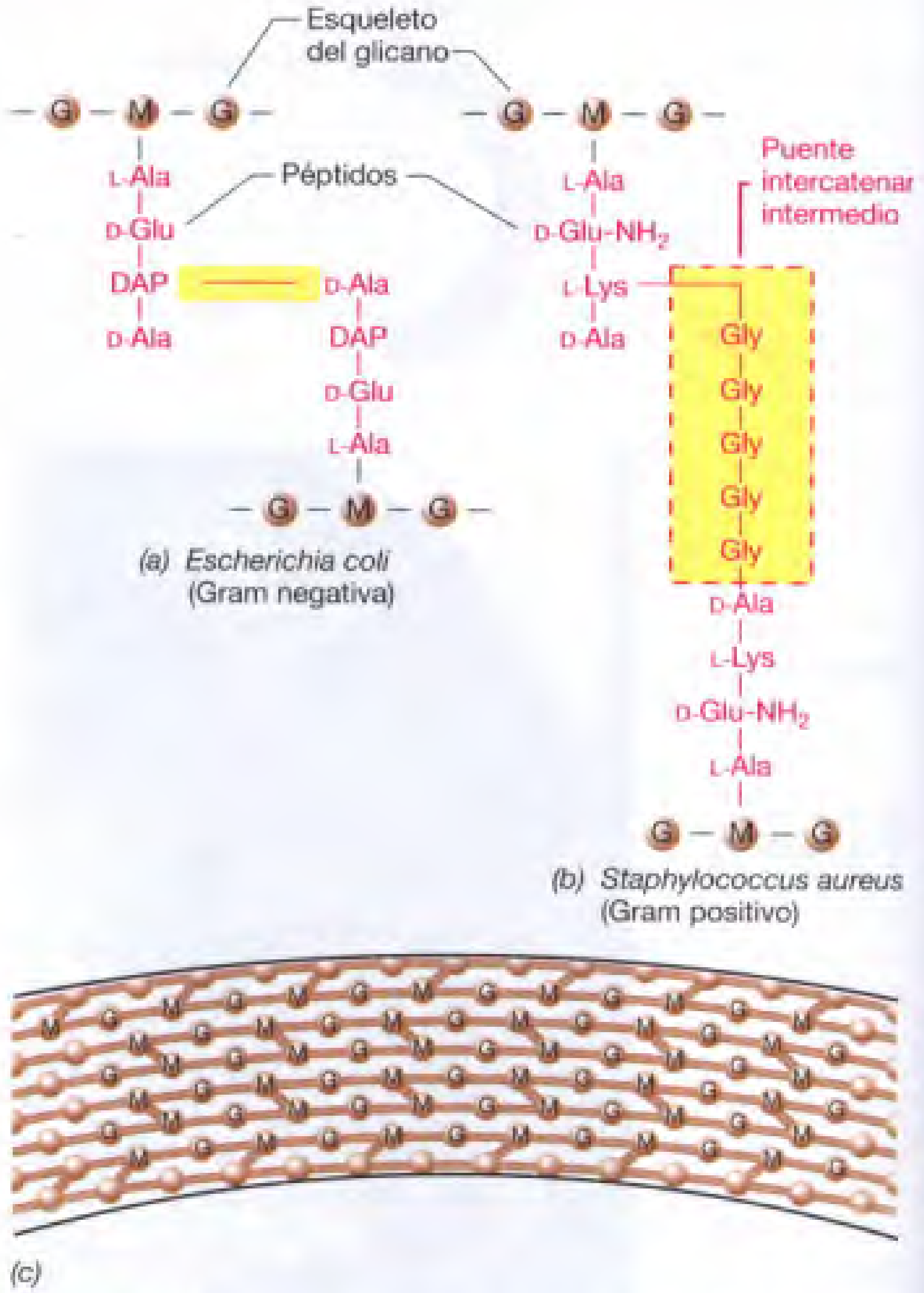

N-Acetilglucosamina (G)
Ácido *N*-acetilmurámico (M)
CH_2OH
β(1,4)
Grupo *N*-acetilo
Uniones peptídicas
Enlace sensible a la acción de la lisozima
L-Alanina
Ácido D-glutámico
Ácido meso-diaminopimélico
D-Alanina

Figura 4.30 Estructura de una unidad repetitiva del peptidoglicano de la pared celular con el tetrapéptido. La estructura mostrada corresponde a *Escherichia coli* y muchas otras bacterias Gram negativas. En algunas bacterias, se encuentran otros aminoácidos.


Esqueleto del glicano
G
M
Péptidos
L-Ala
D-Glu
DAP
D-Ala
D-Glu-NH$_2$
L-Lys
Gly
Puente intercatenar intermedio
(c)

(a) *Escherichia coli* (Gram negativa)

(b) *Staphylococcus aureus* (Gram positivo)

Figura 4.31 Conexión entre las unidades peptídicas y las de glicano en la formación de una lámina de peptidoglicano. (a) Sin puente intermedio en bacterias Gram negativas. (b) con un puente intermedio de pentaglicina en la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*. (c) Estructura global del peptidoglicano. El diagrama muestra varias cadenas de peptidoglicano con puentes intercatenarios entre ellos. Para visualizar una capa completa de peptidoglicano hay que imaginar que este esquema se extiende alrededor de un cilindro o una esfera, que representaría la célula. G, *N*-acetilglucosamina; M, ácido *N*-acetilmurámico; las líneas rojas gruesas en (c) indican los puentes peptídicos.

Diversidad del peptidoglicano

El peptidoglicano sólo se presenta en el dominio *Bacteria*; entre los constituyentes de las paredes de *Archaea* o de *Eukarya* nunca se ha encontrado el ácido *N*-acetilmurámico ni el aminoácido diaminopimélico. Sin embargo, no todas las *Bacteria* tienen DAP en su peptidoglicano. Este aminoácido se encuentra en todas las *Bacteria* Gram negativas y en algunas Gram positivas, pero la mayoría de los cocos Gram positivos poseen lisina en lugar de DAP y otras *Bacteria* Gram positivas contienen otros aminoácidos. Otra carácterística poco común de la pared celular bacteriana es la presencia de dos aminoácidos que presentan configuración D, la D-alanina y el ácido D-glutámico. Como se vio en el Capítulo 3, los aminoácidos de las proteínas presentan siempre la configuración L (*véase* Sección 3.6).

La estructura del peptidoglicano sigue unas normas generales. La porción de carbohidrato es uniforme, presentando solamente *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico conectados siempre a través de enlace β-1,4. El tetrapéptido de la unidad repetitiva sólo varía en un aminoácido, bien lisina o DAP. No obstante, en algunos microorganismos el ácido D-glutámico puede ser hidroxilado en la posición 2 y en otros pueden darse sustituciones de aminoácidos en las posiciones 1 y 3.

Se conocen más de 100 tipos distintos de peptidoglicano cuyas variaciones más importantes se refieren a los puentes interpeptídicos. Cualquier aminoácido presente en el tetrapéptido también puede presentarse en el puente, pero además otros aminoácidos como glicina, serina, treonina y ácido aspártico pueden también estar presentes. No obstante, hay ciertos aminoácidos que nunca se presentan en los puentes interpeptídicos: ni aminoácidos ramificados, ni aromáticos, ni azufrados, ni histidina, arginina o prolina. Se puede afirmar que si bien puede variar la química exacta del peptidoglicano, la forma estructural del peptidoglicano es la misma en todos los casos: la *N*-acetilglucosamina y el ácido *N*-acetilmurámico forman el esqueleto estructural y las moléculas de *N*-acetilmurámico se unen entre sí a través de aminoácidos.

Ácidos teicoicos y resumen de la pared de las Gram positivas

Muchas *Bacteria* Gram positivas presentan embebidos en su pared polisacáridos ácidos denominados **ácidos teicoicos**. El término *ácidos teicoicos* se refiere a los polímeros de la pared, de la membrana o de la cápsula que contienen unidades de glicerolfosfato o de ribitolfosfato. Estos polialcoholes están unidos por ésteres fosfato y a menudo presentan unidos otros azúcares y D-alanina (Figura 4.32*a*). Debido a su carga negativa, los ácidos teicoicos son, en parte, responsables de la carga negativa neta de la superficie de las células y puede intervenir en el paso de iones a través de la pared celular. Algunos de estos ácidos que contienen glicerol están unidos a los lípidos de la membrana de las *Bacteria* Gram positivas y debido a esta íntima asociación con lípidos, tales ácidos teicoicos se denominan también *ácidos lipoteicoicos*.

La Figura 4.32*b* resume la estructura de la pared celular de las *Bacteria* Gram positivas y muestra la disposición de los ácidos teicoicos en la estructura global.

Células sin paredes celulares

El peptidoglicano, que representa una molécula característica del dominio *Bacteria*, puede ser destruido por la acción de algunos agentes. Uno de estos agentes es la **lisozima**, una enzima que rompe los enlaces glicosídicos β-1,4 entre las unidades de *N*-acetilglucosamina y de *N*-acetilmurámico presentes en el peptidoglicano (Figura 4.30), y que en consecuencia debilita la pared. El agua puede entonces entrar en la célula, y ésta se hincha y eventualmente explota, en un fenómeno que se denomina **lisis** (Figura 4.33*a*). La lisozima se encuentra en algunas secreciones animales como las lágrimas, la saliva y otros fluidos corporales, y probablemente representa una importante barrera de defensa contra las infecciones bacterianas.

Si se añade al medio una concentración adecuada de un soluto que no penetre en la célula, como la sacarosa, la presión osmótica externa equilibra entonces la presión inter-

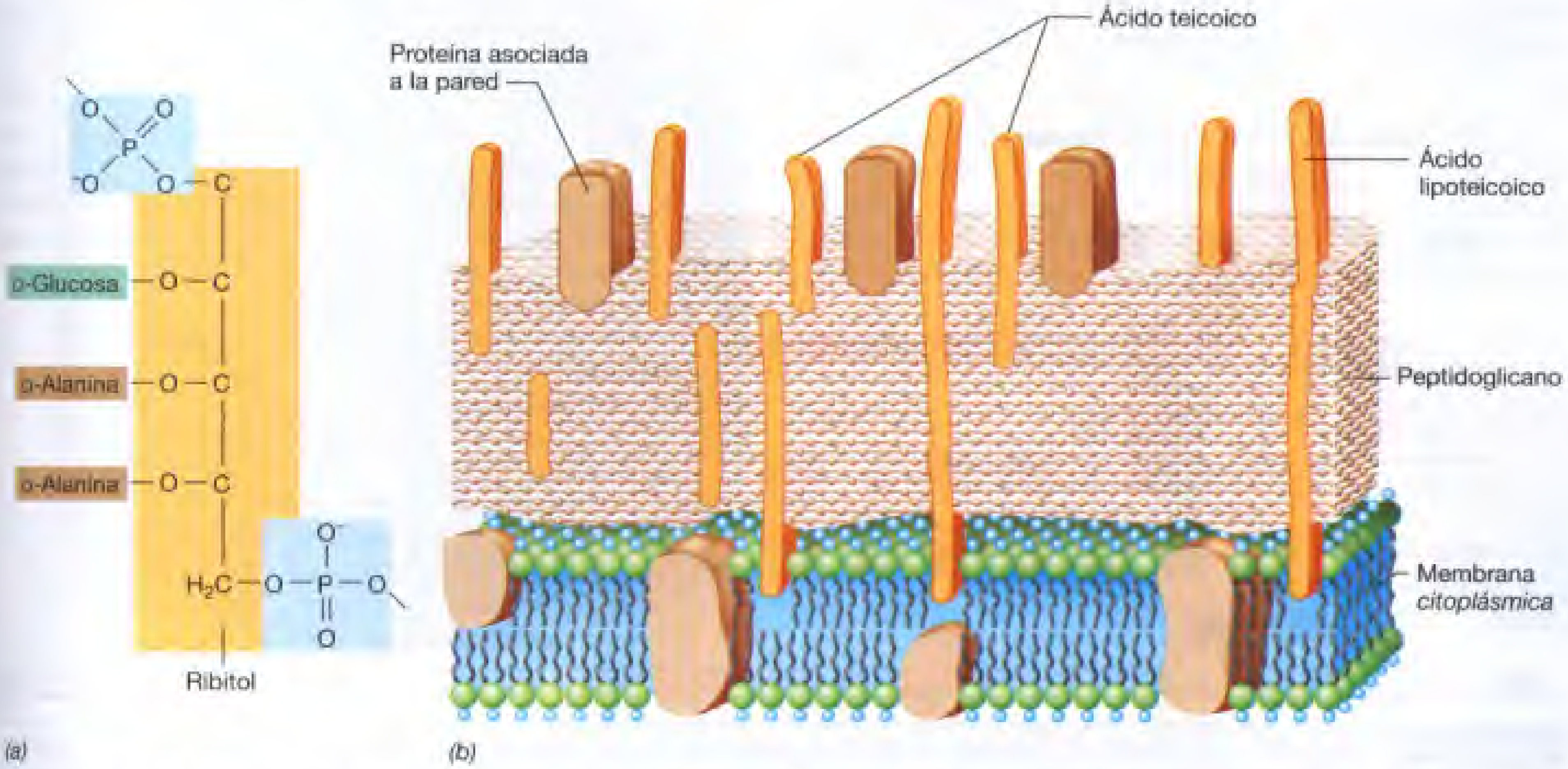


Figura 4.32 Ácidos teicoicos y estructura global de la pared celular Gram positiva. (a) Estructura del ácido ribitolteicoico de *Bacillus subtilis*. El ácido teicoico es un polímero de unidades repetitivas de ribitol como las que se muestran. (b) Diagrama global de la pared celular Gram positiva.

na (condiciones isotónicas). En estas condiciones, la lisozima puede digerir el peptidoglicano pero el agua no entra en la célula y, por tanto, no ocurre la lisis, formándose entonces un **protoplasto** (es decir, una bacteria que ha perdido su pared celular) (Figura 4.33*b*). Si los protoplastos estabilizados con sacarosa se pasan a un medio con agua se lisan inmediatamente. A menudo se usa la palabra *esferoplasto* como un sinónimo de protoplasto, pero ambas palabras tienen un significado ligeramente distinto: los protoplastos son formas normalmente libres de cualquier material residual de la pared celular, mientras que los esferoplastos contienen, por lo general, restos de la pared unidos a la membrana.

Aunque la mayoría de los procariotas no pueden vivir sin pared celular, algunos son capaces de hacerlo. Entre estos últimos están los micoplasmas, que constituyen un grupo que causa ciertas enfermedades infecciosas (*véase* Sección 12.21) y el grupo *Thermoplasma*, que son *Archaea* que carecen de pared celular (*véase* Sección 13.5). Estos procariotas son protoplastos naturales de vida libre, capaces de sobrevivir sin pared porque tienen fuertes membranas poco comunes o porque viven en hábitat osmóticamente protegidos, como el interior del cuerpo humano. Algunos micoplasmas presentan esteroles en sus membranas (*véase* Sección 4.5), lo que confiere resistencia y rigidez a esta estructura.

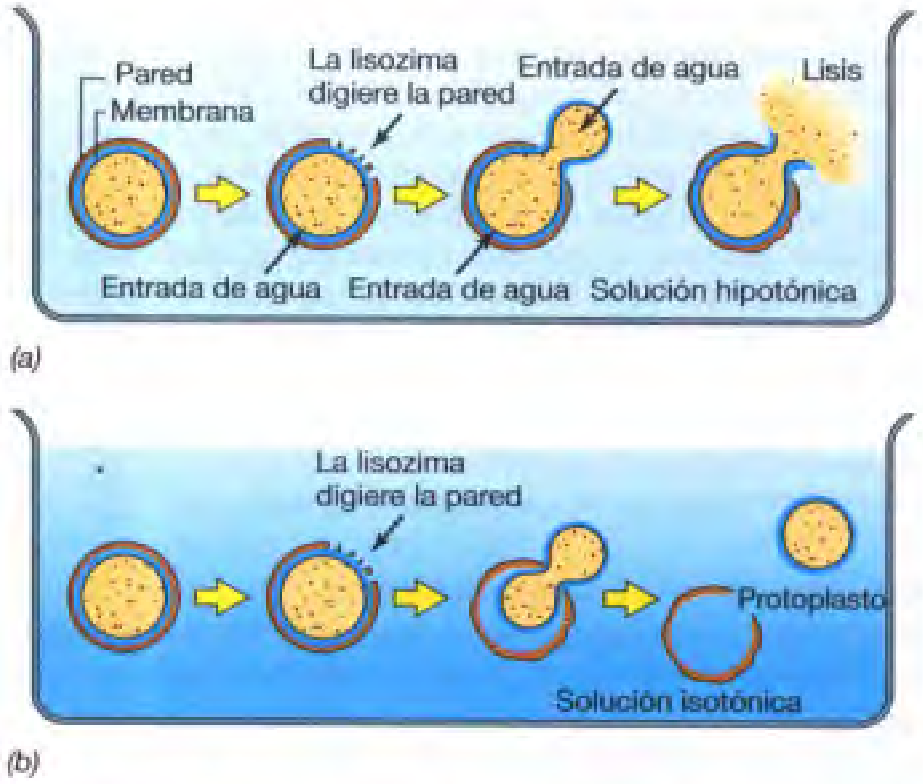

Pared
Membrana
La lisozima digiere la pared
Entrada de agua
Lisis
Entrada de agua
Entrada de agua
Solución hipotónica
(a)
La lisozima digiere la pared
Protoplasto
Solución isotónica
(b)

Figura 4.33 Protoplastos. (a) En una solución diluida, la rotura de la pared libera el protoplasto que inmediatamente se lisa al ser muy débil la membrana *citoplasmática*. (b) En una solución que contenga una concentración isotónica de un soluto, como la sacarosa, el agua no penetra en el protoplasto y no se lisa.

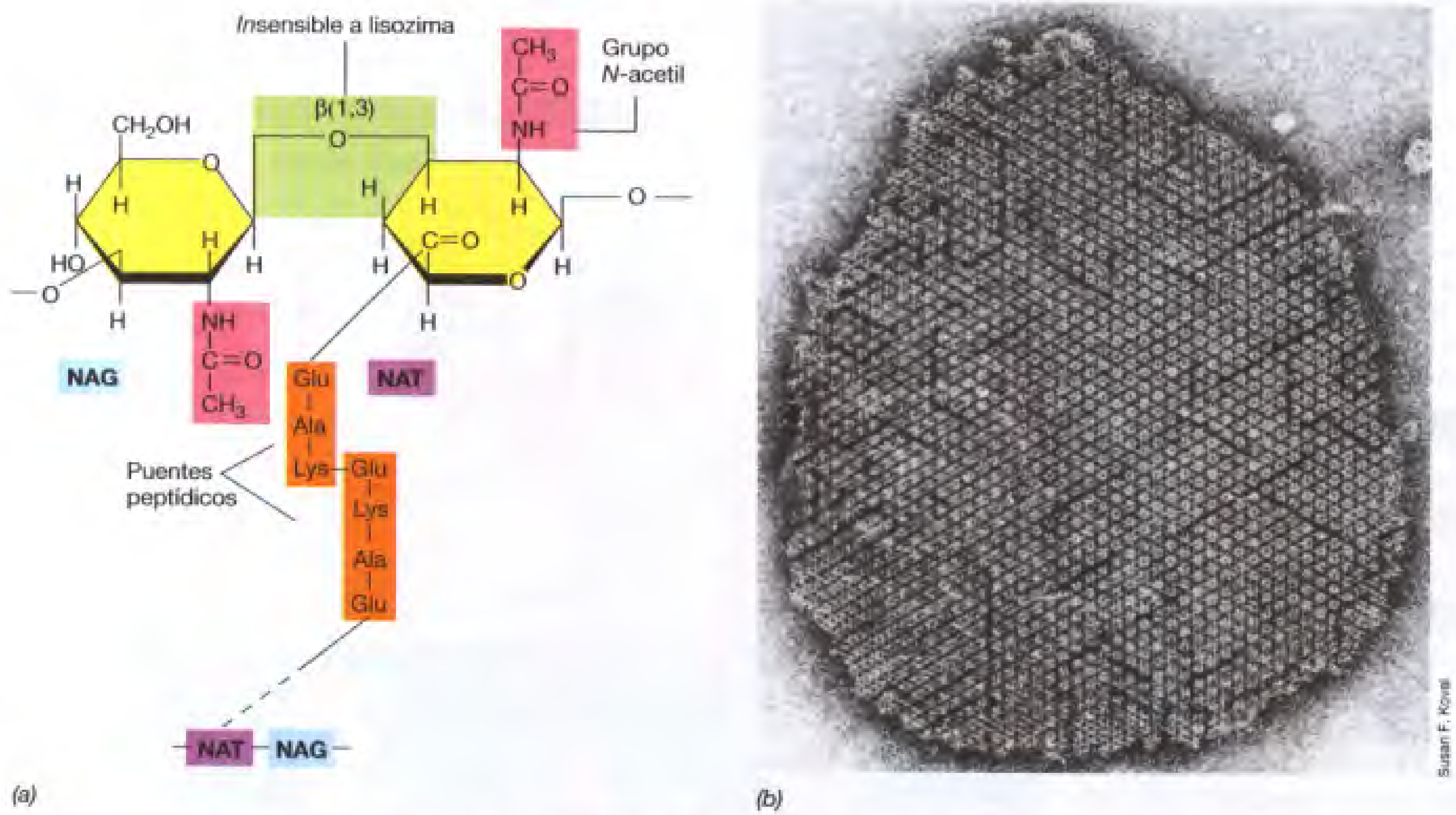

Insensible a lisozima
β(1,3)
O
CH₃
C=O
NH
Grupo N-acetil
CH₂OH
O
H
H
H
HO
O
H
H
H
H
H
C=O
O
H
H
O
NH
C=O
CH₃
NAG
NAT
Glu
Ala
Lys
Glu
Lys
Ala
Glu
Puentes peptídicos
NAT
NAG
(a)
(b)
Susan F. Koval

Figura 4.34 (a) Estructura del pseudopeptidoglicano, el polímero de la pared celular de especies de *Methanobacterium*. Obsérvese el parecido con la estructura del peptidoglicano que se muestra en la Figura 4.30, en especial las conexiones peptídicas, que en este caso se realizan entre unidades de ácido N-acetiltalosaminurónico (NAT) en vez de unidades de ácido *N*-acetilmurámico. (b) Micrografía electrónica de transmisión de una porción de la capa S de la bacteria *Aquaspirillum serpens*, mostrando su estructura paracristalina; esta capa S presenta una simetría hexagonal como ocurre en muchas de las capas S encontradas en *Archaea*.

Pseudopeptidoglicano y otras paredes celulares en *Archaea*

Algunas *Archaea* presentan paredes celulares que contienen un polisacárido similar al peptidoglicano. Este material se llama *pseudopeptidoglicano* (Figura 4.34*a*). El esqueleto del pseudopeptidoglicano lo forman unidades alternativas de *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetiltalosaminurónico, que reemplaza al ácido *N*-acetilmurámico del verdadero peptidoglicano (compárense las Figuras 4.30 y 4.34*a*). Otra diferencia del esqueleto del pseudopeptidoglicano es que presenta los enlaces glicosídicos en uniones β-1,3 en vez de β-1,4 como ocurre en el peptidoglicano (compárense las Figuras 4.30 y 4.34*a*).

Las paredes de otras *Archaea* carecen tanto de peptidoglicano como de pseudopeptidoglicano y están formadas por polisacáridos, glicoproteínas o proteínas. Por ejemplo, las especies de *Methanosarcina* poseen paredes polisacarídicas gruesas compuestas por glucosa, ácido glucurónico, galactosamina y acetato. Las *Archaea* halófilas extremas como *Halococcus* poseen paredes celulares similares a las de *Methanosarcina*, pero presentan adicionalmente una gran abundancia de grupos sulfato (SO_4^{2-}). Sin embargo, el tipo más común de pared entre las *Archaea* es la capa superficial paracristalina (Capa S) que está compuesta por glicoproteína o proteína dispuesta en simetría hexagonal (*véase* Sección 4.13 para más detalles). Las capas S se han encontrado prácticamente en todos los grupos de *Archaea*, como los halófilos extremos, los metanógenos y los hipertermófilos. Algunas especies del dominio *Bacteria* también presentan capas S en sus superficies más externas (Figura 4.34*b*).

Por tanto, entre las especies de *Archaea* se encuentran una gran variedad de tipos de paredes celulares, desde las que presentan moléculas que se parecen al peptidoglicano hasta aquellas que carecen por completo de componente polisacarídico. Sin embargo, salvo raras excepciones, todas las *Archaea* contienen pared de algún tipo que, como en *Bacteria*, evita la lisis osmótica y define la forma celular. Además, debido a que las paredes de *Archaea* no presentan peptidoglicano, todas las *Archaea* son resistentes en condiciones naturales a la acción de la lisozima y las penicilinas, agentes que destruyen este componente o inhiben su síntesis, respectivamente (*véase* Sección 6.2).

✓ 4.8 Revisión de conceptos

En *Bacteria*, las paredes celulares presentan un polisacárido llamado peptidoglicano que está formado por cadenas que contienen unidades alternativas de *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico, y donde este último se une a otras cadenas similares mediante cortos péptidos. En *Archaea*, no hay peptidoglicano pero tienen paredes compuestas por otros polisacáridos o por proteínas. La lisozima es una enzima que destruye el peptidoglicano y ocasiona la lisis de las células.

- ✓ Enumere los monómeros que son componentes del peptidoglicano
- ✓ ¿Por qué el peptidoglicano es una macromolécula rígida?
- ✓ ¿Cómo se genera un protoplasto?
- ✓ ¿Por qué algunas células viven sin pared celular?
- ✓ ¿En qué se parece el pseudopeptidoglicano al peptidoglicano? ¿En qué se diferencian estas moléculas?

4.9 La membrana externa de las *Bacteria* Gram negativas

Además del peptidoglicano, las *Bacteria* Gram negativas poseen en su pared una capa adicional que está compuesta de **lipopolisacárido**. De hecho, esta capa representa una segunda bicapa lipídica, si bien hay que destacar que no consta solamente de fosfolípidos como la membrana citoplasmática, sino que contiene polisacáridos y proteínas. Los lípidos y polisacáridos están estrechamente unidos en la capa externa formando estructuras lipopolisacarídicas específicas. La presencia del lipopolisacárido justifica que la membrana externa se denomine frecuentemente **capa de lipopolisacárido** o simplemente **LPS**. Otro término comúnmente utilizado para esta estructura es el de **membrana externa**.

Composición química del LPS

Actualmente, y pese a su complejidad, se conoce la composición química del LPS de varias bacterias. Como se muestra en la Figura 4.35, la estructura del lipopolisacárido consta de dos porciones: el núcleo del lipopolisacárido

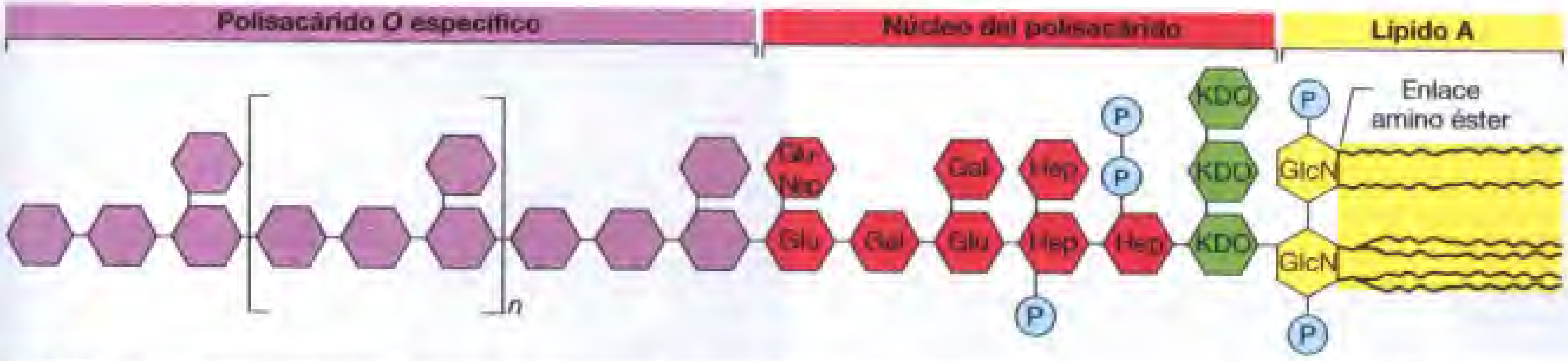


Figura 4.35 Estructura del lipopolisacárido de bacterias Gram negativas. La composición química exacta del lípido A y de los polisacáridos varía entre las diferentes especies de bacterias Gram negativas, pero la secuencia de los elementos principales (lípido A—KDO—núcleo—antígeno O específico)suele ser uniforme. El polisacárido *O* varía siempre entre las especies. KDO, cetodesoxioctonato; Hep, heptosa; Glu, glucosa; Gal, galactosa; GluNac, *N*-acetilglucosamina; GlcN, glucosamina y P, fosfato. La glucosamina y los ácidos grasos del lípido A se unen por enlace amino éster. La porción correspondiente al lípido A del LPS puede ser tóxica para los animales y constituye el denominado *complejo de la endotoxina* (*véase* Sección 21.12). Compárese esta figura con las Figuras 4.36 y 4.37 respecto a los colores que codifican las diferentes porciones del LPS en las Figuras 4.35 y 4.36.

y el polisacárido *O*. En *Salmonella*, donde se ha estudiado con cierto detalle, el **núcleo del polisacárido** está compuesto por cetodesoxioctonato (KDO), azúcares de siete carbonos (heptosas), glucosa, galactosa y *N*-acetilglucosamina. El **polisacárido *O*** está unido al núcleo y consta generalmente de galactosa, glucosa, ramnosa y manosa (azúcares de seis carbonos) así como uno o más dideoxiazúcares poco frecuentes como abecuosa, colitosa, paratosa o tivelosa. Estos azúcares se unen entre sí formando secuencias de cuatro o cinco unidades que a menudo se hallan ramificadas. La repetición de estas secuencias de azúcares da lugar a la formación de un largo polisacárido *O*.

La Figura 4.36 muestra la relación del polisacárido *O* con el resto del LPS. La parte lipídica del lipopolisacárido, conocida como **lípido A** (Figura 4.35), no es un lípido de glicerol si no que los ácidos grasos se unen por una unión amino éster a un disacárido compuesto de *N*-acetilglucosamina-fosfato (Figura 4.35). El disacárido se une al núcleo del polisacárido a través del KDO (Figura 4.35). Los ácidos grasos que normalmente se encuentran en el lípido A son el ácido caproico, laúrico, mirístico, palmítico y esteárico. En la membrana externa, el LPS se asocia con varias proteínas formando la mitad externa de la unidad de membrana. En la porción interna de la membrana externas se encuentra en

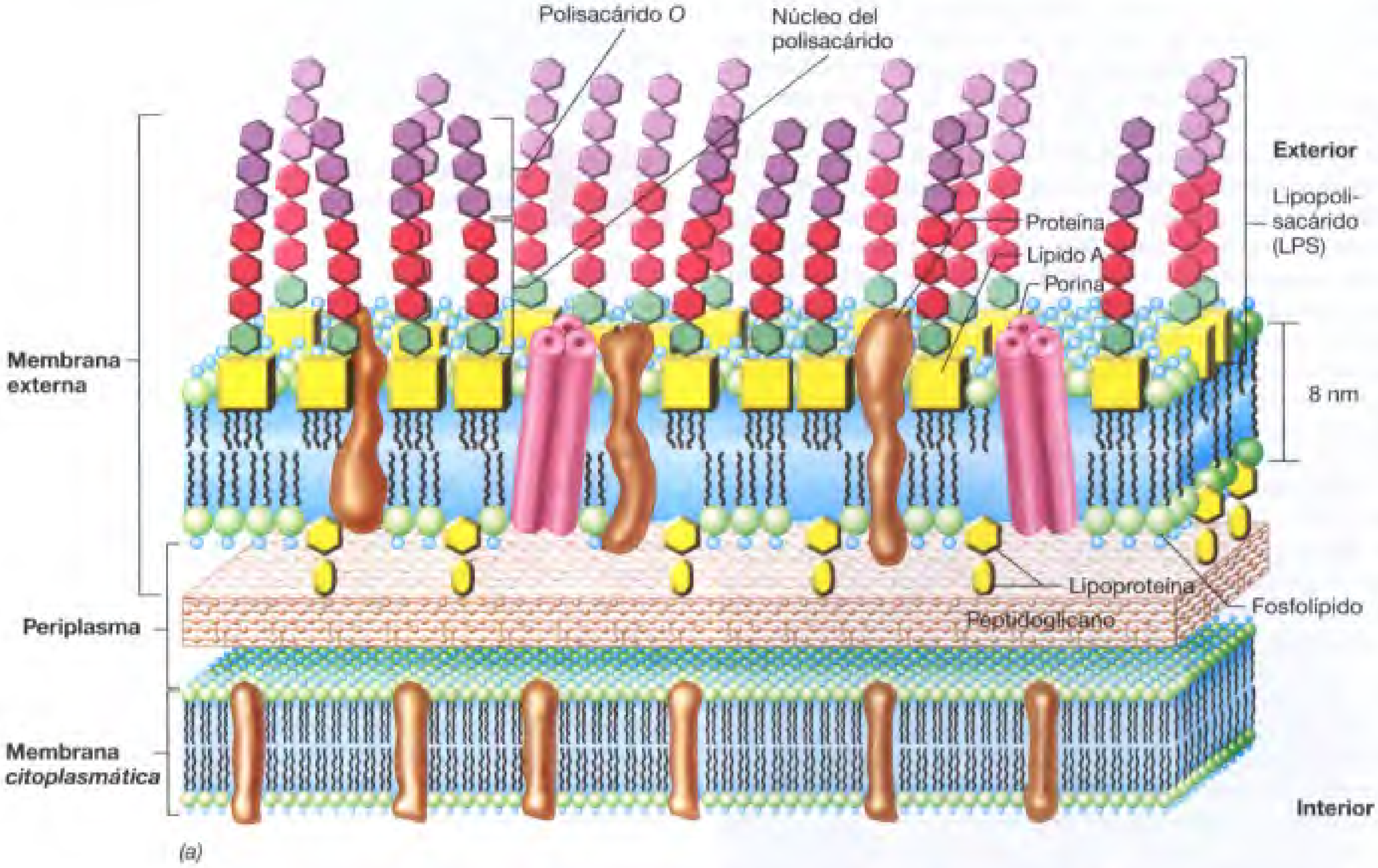
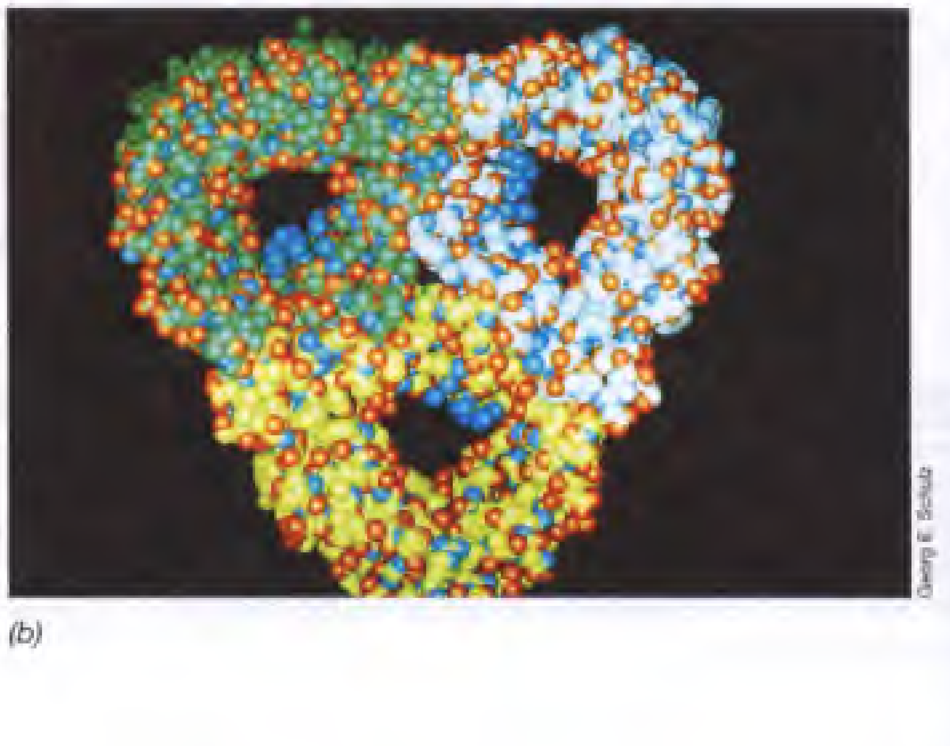

Polisacárido *O*
Núcleo del polisacárido
Exterior
Lipopolisacárido (LPS)
Proteína
Lípido A
Porina
Membrana externa
8 nm
Lipoproteína
Fosfolípido
Peptidoglicano
Periplasma
Membrana *citoplasmática*
Interior
(a)

Figura 4.36 Pared celular Gram negativa. (a) Disposición del lipopolisacárido, lípido A, fosfolípidos, porinas y lipoproteínas en la membrana externa. Consultar la Figura 4.35 para detalles sobre la estructura del LPS. (b) Modelo molecular de las proteínas de las porinas. Obsérvese la presencia de tres poros, cada uno de ellos formado por cada una de las proteínas integrantes de una molécula de porina. Esta visión es perpendicular al plano de la membrana. El modelo está basado en estudios de difracción por rayos X de la porina de *Rhodobacter blasticus*.



Georg E. Schulz

muchas especies de *Bacteria* Gram negativas una **lipoproteína** compleja (Figura 4.36*a*). Esta lipoproteína es una pequeña proteína que funciona como una especie de anclaje entre la membrana externa y el peptidoglicano. En la región *exterior* de la membrana externa, el LPS reemplaza a los fosfolípidos, que se localizan mayoritariamente en la porción interna (Figura 4.36*a*).

Endotoxina

Aunque la principal función de la membrana externa es estructural, una propiedad biológica importante es que es *tóxica* para los animales. Entre las *Bacteria* Gram negativas que son patógenas para el hombre y otros mamíferos se encuentran especies de los géneros *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia*.

Algunos síntomas que provocan estos patógenos en sus hospedadores se deben al efecto tóxico de la membrana externa. Las propiedades tóxicas se asocian con parte del lipopolisacárido de estos organismos, en particular con el lípido A. Como se verá en la Sección 21.11, se usa el término **endotoxina** para referirse a este componente tóxico. Es interesante destacar que el LPS de algunas bacterias no patógenas también tiene propiedades tóxicas. Por tanto, no es necesario que el organismo sea patógeno para que su pared celular contenga elementos tóxicos.

Porinas y periplasma

A diferencia de la membrana citoplasmática, la membrana externa de las *Bacteria* Gram negativas es relativamente permeable a pequeñas moléculas pese a que es básicamente una bicapa lipídica. Esto se debe a la presencia en la membrana externa de unas proteínas llamadas **porinas**, que actúan como canales para la entrada y salida de sustancias hidrofílicas de bajo peso molecular (Figura 4.36). Existen varios tipos de estas porinas y se conocen porinas tanto específicas como inespecíficas. Las porinas *inespecíficas* forman canales rellenos de agua a través de los cuales puede pasar cualquier tipo de sustancias pequeñas. Por el contrario, algunas porinas son muy específicas porque contienen un sitio de unión específico para una o más sustancias.

Los estudios estructurales demuestran que las porinas son proteínas que constan de *tres* subunidades idénticas. Se trata de proteínas transmembranales (Figura 4.36*a*) que se asocian para formar pequeños agujeros en la membrana de aproximadamente 1 nm de diámetro (Figura 4.36*b*). Por la acción de las porinas, la membrana externa es relativamente permeable a moléculas pequeñas. Sin embargo, no resulta permeable a enzimas o moléculas más grandes. De hecho, una de las funciones de la membrana externa es precisamente retener algunas enzimas que están situadas fuera de la membrana citoplasmática evitando así su libre difusión al medio. Estas enzimas se localizan en una región denominada **periplasma** (*véanse* Figuras 4.36 y 4.37). En *Escherichia coli*, este espacio entre la membrana citoplasmática y la superficie interna de la membrana externa ocupa una distancia aproximada de 12-15 nm y tiene una consistencia gelatinosa, probablemente por la abundancia de proteínas periplásmicas (Figura 4.37). El periplasma contiene varios tipos de proteínas, entre ellas *enzimas hidrolíticas*, que llevan a cabo la degradación inicial de algunos nutrientes, *proteínas de unión*, que inician el proceso del transporte de sustratos (*véase* Sección 4.7); y *quimiorreceptores*, que son proteínas implicadas en respuestas quimiotácticas (*véanse* Secciones 4.12 y 8.11). Como se ha indicado previamente, estas proteínas alcanzan el periplasma por medio de sistemas de transporte (*véase* Sección 4.7).

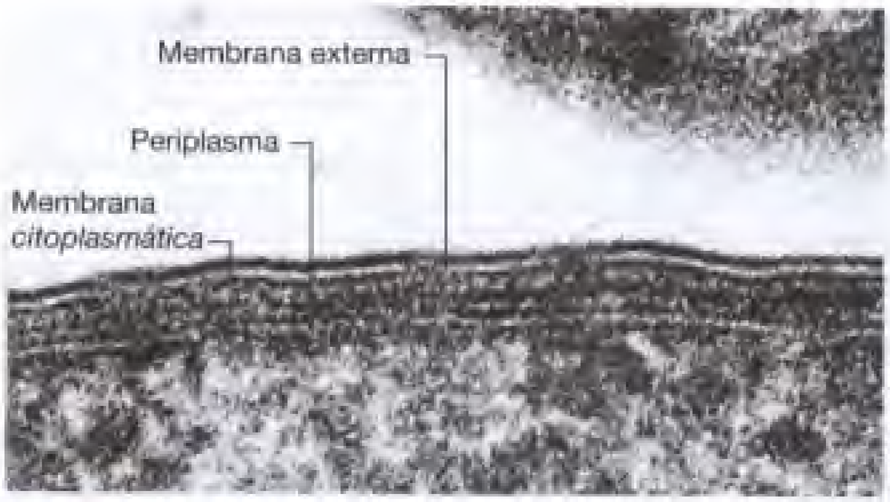


Figura 4.37 Magnificación de un corte fino de la envoltura celular de *Escherichia coli* mostrando el espacio periplásmico delimitado por la membrana externa y la membrana *citoplasmica*. Las partículas oscuras grandes en el citoplasma son ribosomas.

Relación entre la estructura de la pared celular y la tinción de Gram

Las diferencias estructurales entre las paredes celulares de las *Bacteria* Gram positivas y Gram negativas son las responsables del diferente comportamiento de las células a la tinción de Gram. En dicha tinción (*véase* Sección 4.1), se forma dentro de las células un complejo cristal insoluble violeta-yodo que en el caso de las Gram negativas puede extraerse con alcohol, pero no en las Gram positivas. El alcohol deshidrata las *Bacteria* Gram positivas, que poseen paredes celulares muy gruesas con varias capas de peptidoglicano. Esto provoca el cierre de los poros de las paredes impidiendo la salida del complejo cristal violeta-yodo. En las *Bacteria* Gram negativas, el alcohol penetra rápidamente en la capa externa que es rica en lípidos y la fina capa de peptidoglicano no impide el paso del solvente, por lo que el complejo se extrae fácilmente.

✓ 4.9 Revisión de conceptos

Las *Bacteria* Gram negativas, además de peptidoglicano, poseen en su pared una membrana externa que contiene lipopolisacárido, proteína y lipoproteína. Las proteínas llamadas porinas facilitan la permeabilidad a través de la membrana externa. El espacio entre las membranas es el periplasma, que contiene varias proteínas de importancia en diversas funciones celulares.

- ✓ ¿Qué componentes forman la capa de LPS en las *Bacteria* Gram negativas?
- ✓ ¿Cuál es la función de las porinas y su localización en una pared Gram negativa?
- ✓ ¿Qué componente específico de la célula tiene propiedades de endotoxina?
- ✓ ¿Por qué el alcohol decolora rápidamente las *Bacteria* Gram negativas?

III MOVIMIENTO MICROBIANO

Muchas células son móviles. Aunque el movimiento requiere gasto de energía, la capacidad de movimiento dentro de un hábitat tiene importantes consecuencias ecológicas, ya que puede suponer la vida o la muerte de la célula. En las siguientes secciones se exponen los diferentes tipos de movimiento, por desplazamiento en medio líquido y por deslizamiento, y se considera que la capacidad para moverse hacia un determinado estímulo o para huir de él puede ser beneficioso para la célula.

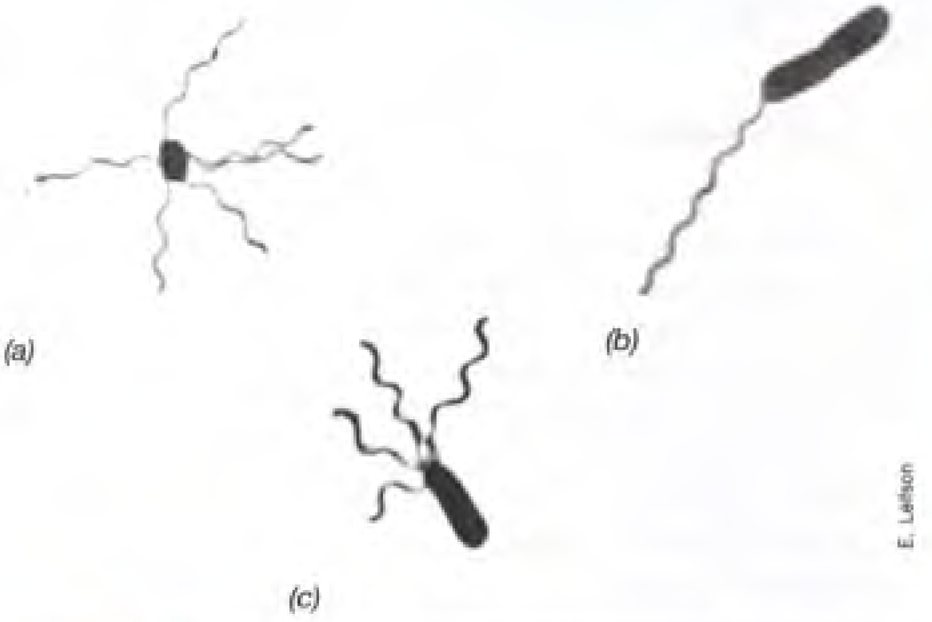
4.10 Flagelos y movilidad

Muchos procariotas son móviles y esta capacidad de movimiento independiente se debe con frecuencia a una estructura especial, el **flagelo** (plural, **flagelos**) (Figura 4.38). Algunas bacterias se desplazan a lo largo de superficies sólidas por *deslizamiento* (*véase* Sección 4.11) y otros microorganismos acuáticos son capaces de controlar su posición en el agua mediante unas estructuras llenas de gas denominadas vesículas de gas (*véanse* Secciones 4.14 y 12.25). Sin embargo, la mayor parte de los procariotas móviles utilizan flagelos para moverse. La movilidad permite a la célula alcanzar distintas zonas de su entorno. En la lucha por la supervivencia, la capacidad para moverse puede significar la diferencia entre la vida y la muerte de la célula. Como ocurre en cualquier proceso físico, el movimiento celular supone un gasto de energía. Analizaremos con detalle la movilidad mediante flagelos en procariotas.

Flagelos bacterianos

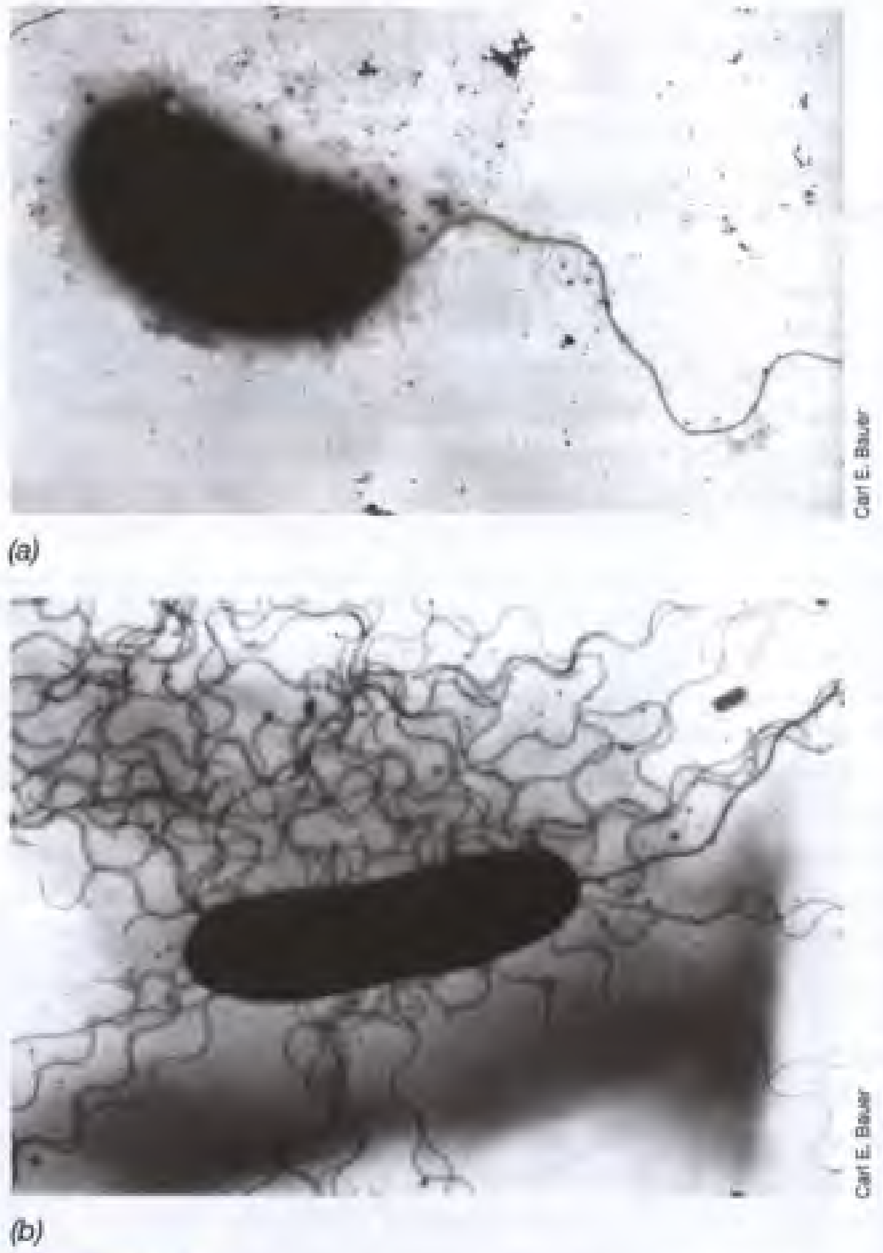
Los flagelos bacterianos son apéndices largos y finos que se encuentran libres por un extremo y unidos a la célula por el otro. Como son tan finos (unos 20 nm) no es posible verlos en el microscopio óptico y hay que recurrir a tinciones específicas para flagelos que aumentan su diámetro (Figura 4.38). Los flagelos se observan fácilmente al microscopio electrónico (Figura 4.39).

La disposición de los flagelos varía según las bacterias. En la **flagelación polar**, los flagelos se localizan en uno o ambos extremos de la célula. En ocasiones, de un extremo de la célula puede surgir un penacho de flagelos, una disposición que se conoce como **flagelación lofotrica** (de *lofos*, penacho, y *tricos*, pelo) (Figura 4.38*c*). El microscopio de campo oscuro permite observar este tipo de flagelación en células vivas (*véanse* Sección 4.1 y Figura 4.40*a*), apareciendo los flagelos claros unidos a las células sobre un fondo oscuro. En procariotas de gran tamaño, se pueden observar también penachos de flagelos mediante el microscopio de contraste de fases (Figura 4.40*b*). En la **flagelación peritrica**, los flagelos se distribuyen por varios lugares de la superficie celular (*peri*, alrededor). El tipo de disposición flagelar, polar o peritrica, se utiliza a menudo como criterio de clasificación de bacterias.



E. Leifson

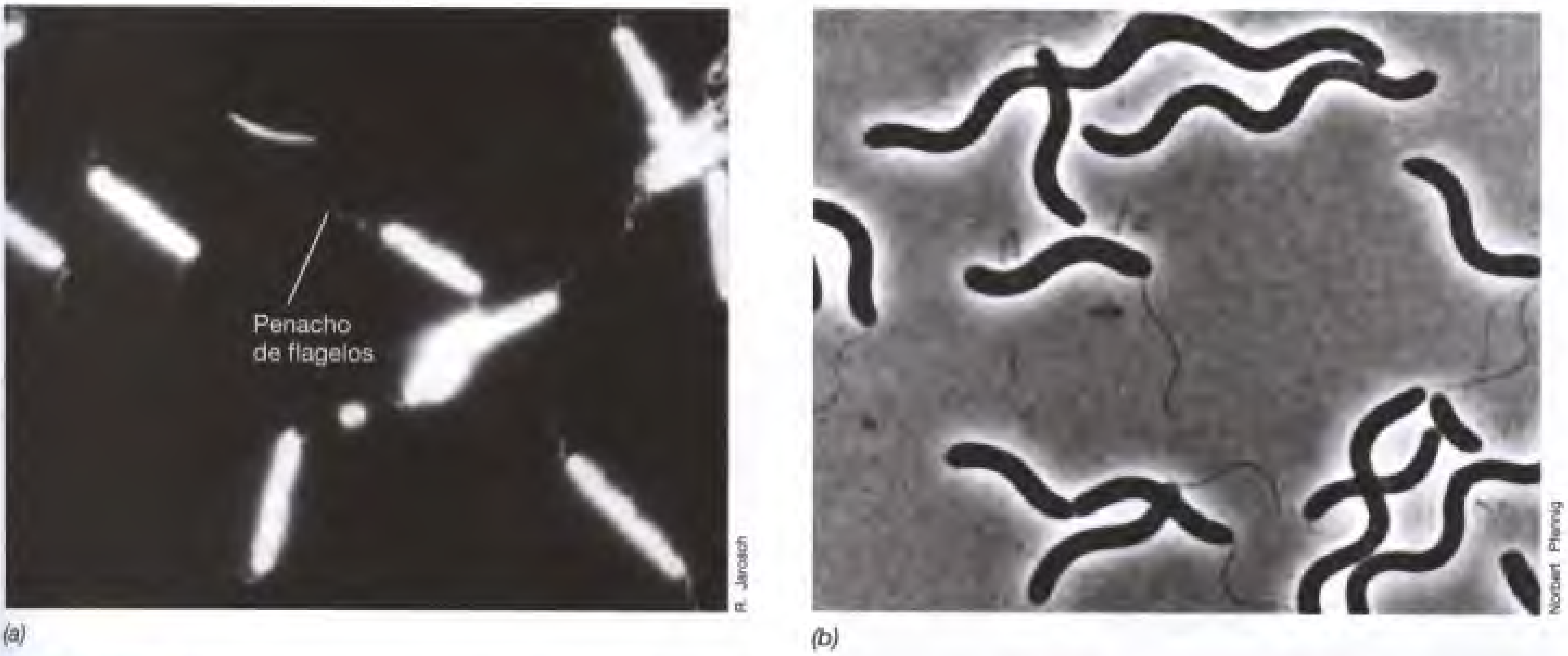
Figura 4.38 Micrografías ópticas de procariotas con diferente disposición flagelar. Las células se tiñeron con la tinción flagelar de Leifson. (a) Peritrica. (b) Polar. (c) Lofotrica.



Carl E. Bauer

Carl E. Bauer

Figura 4.39 Flagelos bacterianos observados por tinción negativa en un microscopio electrónico de transmisión. (a) Flagelos polares. (b) Flagelos peritricos. Ambas micrografías corresponden a células de la bacteria fototrofa *Rhodospirillum centenum*, que normalmente presenta flagelación polar, pero que bajo ciertas condiciones de crecimiento forma células con flagelación peritrica. *Véase* también la Figura 4.48*b*.



R. Jarosch

Norbert Pfennig

Figura 4.40 Flagelos bacterianos observados en células vivas. (a) Micrografía en campo oscuro de un grupo de bacilos con un penacho de flagelos en cada polo. Cada célula tiene 2 μm de ancho. La microscopía de campo oscura usa iluminación horizontal para producir luz reflejada (*véase* Sección 4.1 y Figura 4.5c). (b) Micrografía de contraste de fases de la bacteria fototrofa roja *Rhodospirillum photometricum*. Cada célula mide aproximadamente 3 × 30 μm. Nótese como de uno de los polos sale un penacho de flagelos.

Estructura flagelar

La forma de los flagelos no es recta sino helicoidal. Muestran una distancia constante entre cada dos curvas o vueltas adyacentes que se denomina *longitud de onda* y que es constante para cada organismo (Figuras 4.38-4.40). El filamento del flagelo bacteriano está compuesto de subunidades de una proteína llamada **flagelina**. La forma y la longitud de onda de un flagelo están determinadas en parte por la estructura de la flagelina, y también en parte por la dirección de la rotación del filamento. La arquitectura flagelar básica que se describe aquí varía poco entre las diversas especies dentro de *Bacteria*, pero en *Archaea* se conocen varios tipos de flagelinas y es probable que la estructura global del flagelo difiera considerablemente de la presente en *Bacteria*. Dentro de este último dominio, la estructura de la flagelina está muy conservada, lo que sugiere que la movilidad por flagelos tiene profundas raíces evolutivas.

La base del flagelo presenta una estructura diferente a la del filamento (Figura 4.41). En la base existe una región más ancha que se llama *gancho*, consta de un tipo único de proteína y su función es unir el filamento a la parte motora del flagelo. El *motor* del flagelo está anclado en la membrana citoplasmática y en la pared celular, y está constituido por un eje central que atraviesa un sistema de anillos. En *Bacteria* Gram negativas, existe un anillo externo que está anclado en la capa de lipopolisacárido, otro en la capa de peptidoglicano de la pared celular y un anillo interno situado en la membrana citoplasmática (Figura 4.41). En las *Bacteria* Gram positivas, como carecen de la capa externa de lipopolisacárido, sólo existe el par de anillos internos. Alrededor del anillo interno y anclado también en la membrana citoplasmática se encuentra un par de proteínas denominadas Mot (Figura 4.41). Estas proteínas controlan realmente el motor flagelar provocando la rotación del filamento. Finalmente, otro conjunto de proteínas denominadas proteínas Fli funcionan como un conmutador del motor, invirtiendo la rotación del flagelo en respuesta a señales intracelulares (Figura 4.41).

Síntesis del flagelo

La síntesis del flagelo, y por lo tanto la movilidad, depende de varios genes. Los estudios realizados con *Escherichia coli* y *Salmonella tiphymurium* indican que hay más de 40 genes implicados en el movimiento. Estos genes realizan varias funciones y codifican tanto las proteínas estructurales del aparato flagelar, como la salida de los componentes del flagelo a través de la membrana. Además, están implicados en la regulación de muchos procesos bioquímicos que tienen lugar durante la síntesis de nuevos flagelos.

Un flagelo considerado individualmente no crece desde su base como lo hace un pelo de un animal, sino que crece por su punta. El anillo MS se sintetiza inicialmente y se inserta en la membrana. Luego se sintetizan otras proteínas de anclaje junto con el gancho antes de que se inicie la formación del filamento flagelar (Figura 4.42). Las moléculas de flagelina se sintetizan en el citoplasma y pasan a través de un canal de 3 nm situado en el interior del filamento hasta situarse por aposición en su extremo. En el extremo de un flagelo en crecimiento existe una proteína terminal (proteína «cap») que ayuda a las moléculas de flagelina que difunden por el canal interior a distribuirse de forma organizada en el extremo terminal, mientras se

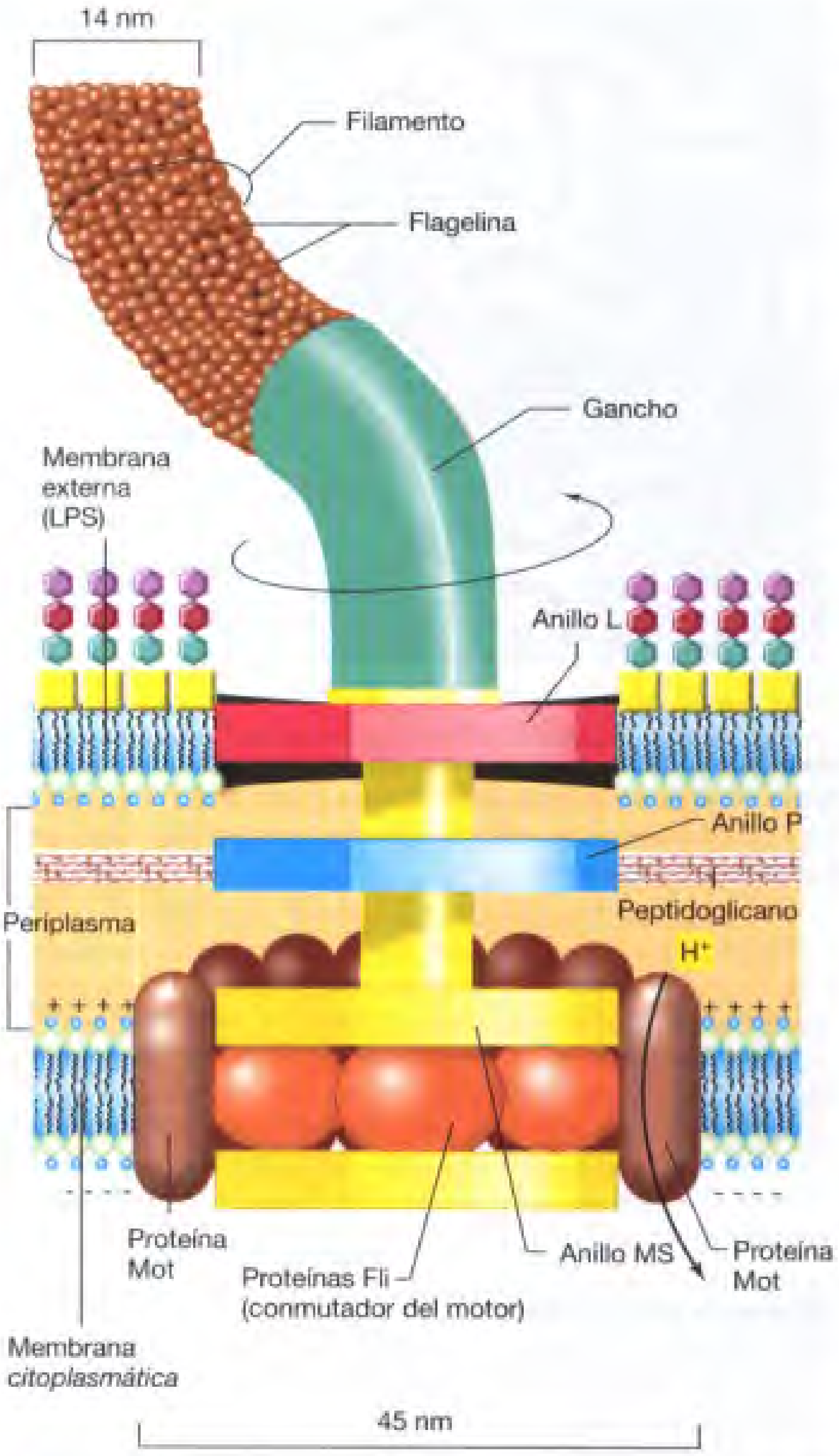


Figura 4.41 Estructura del flagelo procariota y su unión a la pared celular y a la membrana en una bacteria Gram negativa. El anillo L se inserta en la capa de LPS, y el anillo P en el peptidoglicano. El anillo MS se inserta en la membrana *citoplasmática*. En el filamento existe un estrecho canal a través del cual las moléculas de flagelina alcanzan su destino durante la síntesis del flagelo. Las proteínas Mot funcionan como un motor flagelar, mientras que las proteínas Fli constituyen el conmutador del motor. El motor flagelar hace girar el filamento para propulsar a la célula a través del medio.

forma la nueva porción del filamento (Figura 4.42). El crecimiento del flagelo ocurre de modo continuo hasta que alcanza su longitud final. Los flagelos rotos son todavía capaces de rotar y pueden ser reparados por nuevas unidades de flagelina que llegan a través del canal del filamento para reemplazar las unidades proteicas perdidas.

Movimiento flagelar

¿De qué manera se comunica el movimiento al flagelo? Cada flagelo es una estructura semirrígida poco flexible pero, como ya se mencionó anteriormente, es capaz de moverse por rotación como si se tratara de una hélice. Este mecanismo puede ponerse de manifiesto observando la conducta de células móviles que han sido fijadas a través de sus flagelos a los portas de un microscopio. Dichas células rotan alrededor del punto de fijación a revoluciones similares a las del movimiento flagelar cuando las células nadan libremente.

El movimiento de rotación del flagelo parte del cuerpo basal que funciona como un motor. La energía necesaria para la rotación del flagelo proviene de la fuerza motriz generada por el gradiente de protones (*véanse* Secciones 4.6 y 5.12). El flujo de protones a través de la membrana se realiza por el complejo Mot (Figura 4.41) y estimula la rotación del flagelo, habiéndose estimado que por cada rotación del flagelo se traslocan aproximadamente 1000 protones.

Los flagelos no rotan a velocidad constante, sino que la velocidad de rotación aumenta o disminuye en función de la intensidad de la fuerza motriz de protones. La rotación flagelar puede mover a las bacterias a través de un medio líquido a velocidades de hasta 60 veces la longitud de esa bacteria por segundo. Aunque esto sólo supone aproximadamente 0,00017 km/h, es muy alta cuando se compara esta velocidad con la de organismos superiores en términos de longitudes corporales desplazadas por segundo. El guepardo, que es el animal terrestre más veloz, se mueve a una velocidad máxima de unos 110 km/h, lo que representa tan sólo unas 25 longitudes corporales por segundo. Por tanto, teniendo en cuenta el tamaño, las células procarióticas nadando a 50-60 longitudes por segundo en realidad se desplazan mucho más rápido que los organismos superiores.

Los movimientos de los organismos con flagelación polar y lofotrica son distintos de los que poseen flagelación perítrica. Estos últimos se mueven por lo general en línea recta de manera lenta y continuada. Los que presentan flagelos polares, por el contrario, se mueven más rápidamente y dan giros periódicos. Este comportamiento diferente en organismos con flagelos polares, con flagelos perítricos o las diferencias en la reversibilidad del flagelo se ilustran en la Figura 4.43.

✓ 4.10 Revisión de conceptos

La movilidad en microorganismos se asocia generalmente a la presencia de flagelos. En procariotas, el flagelo es una estructura compleja compuesta por varias proteínas, la mayoría de las cuales se anclan en la pared celular y en la membrana. El filamento del flagelo, formado por un solo tipo de proteína, gira gracias a la fuerza motriz de protones que impulsa el motor flagelar.

- ✓ ¿Qué es la *flagelina* y dónde se encuentra?
- ✓ ¿Cómo mueve el flagelo bacteriano a una célula?
- ✓ ¿En qué difiere la *flagelación polar* de la *flagelación perítrica*?

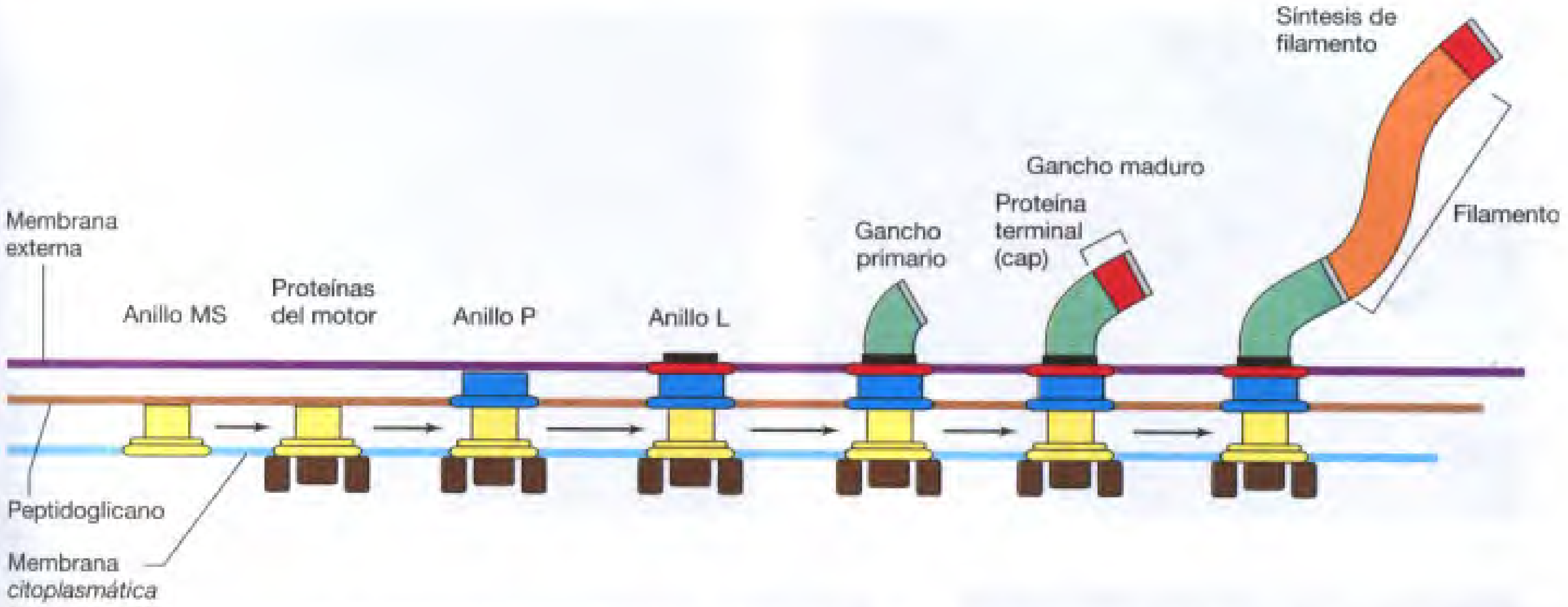
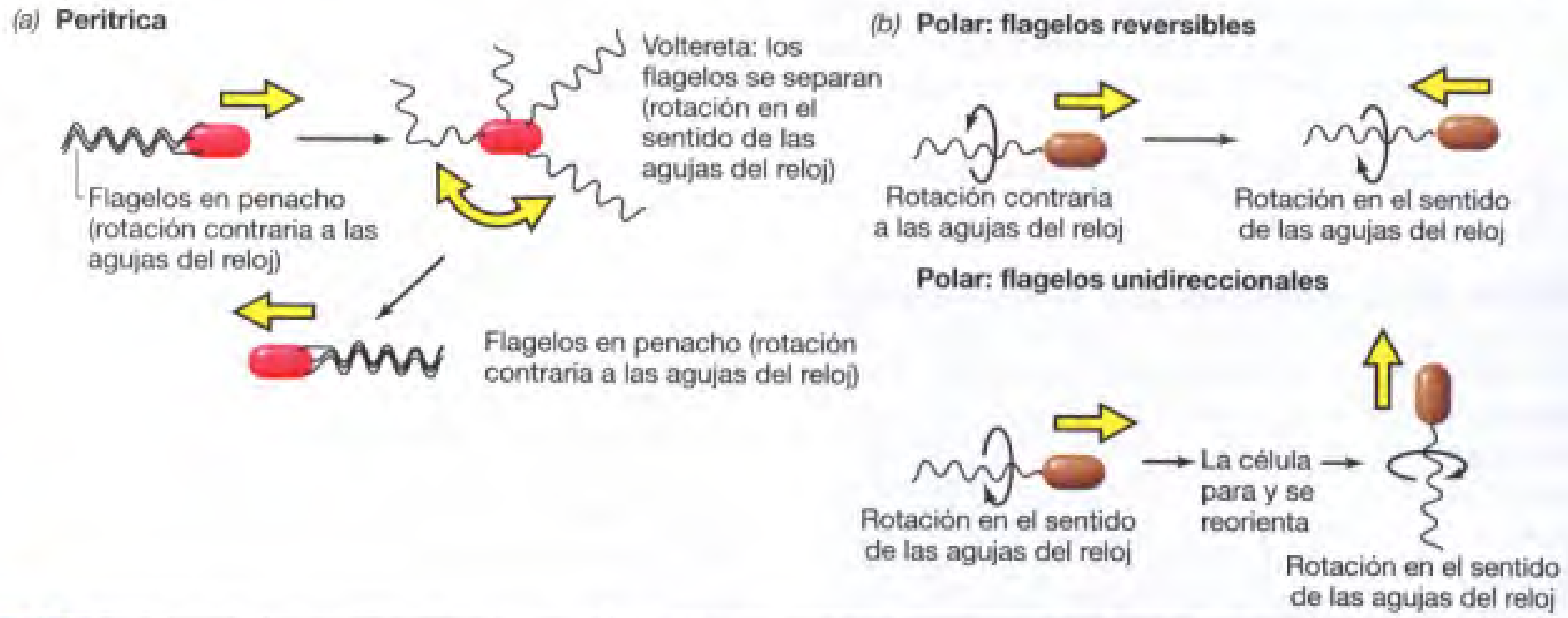

Membrana
externa
Anillo MS
Proteínas
del motor
Anillo P
Anillo L
Gancho
primario
Gancho maduro
Proteína
terminal
(cap)
Síntesis de
filamento
Filamento
Peptidoglicano
Membrana
citoplasmática

Figura 4.42 Resumen de las fases de la biosíntesis del flagelo. La síntesis comienza con el ensamblaje del anillo MS en la membrana, seguida de la formación de los otros anillos, el gancho y la proteína terminal (cap). La flagelina (de la que se necesitan unas 20.000 moléculas para hacer un filamento) se desplaza hasta el gancho para hacer el filamento. Las moléculas de flagelina se sitúan en su posición correcta mediante las proteínas terminales (cap) que aseguran que el desarrollo del filamento en crecimiento es uniforme.

4.11 Movilidad por deslizamiento

Muchos procariotas son móviles aunque carecen de flagelos. Estas bacterias se mueven sobre superficies sólidas mediante un mecanismo de **deslizamiento**. La movilidad por deslizamiento se presenta con frecuencia en el dominio *Bacteria* pero sólo se ha estudiado con detalle en unos cuantos grupos. Este tipo de movimiento, que permite alcanzar desplazamientos de hasta 10 μm/s en algunas bacterias deslizantes, es considerablemente más lento que el proporcionado por flagelos pero permite a la célula moverse por su hábitat.

Los procariotas que se mueven por deslizamiento suelen ser células filamentosas o bacilares (Figura 4.44) y el proceso requiere que exista contacto entre las células y una superficie sólida. La morfología típica de las colonias de una bacteria deslizante son peculiares, dado que las células se mueven y se desplazan del centro de la colonia (Figura 4.44*c*). Recuérdese que las colonias son masas de células bacterianas que se originan por la división sucesiva de una célula inicial (*véase* Sección 5.3). Algunas de las bacterias deslizantes más conocidas son las cianobacterias filamentosas (*véanse* Figura 4.44*a*, *b* y Sección 12.25), algunas *Bacteria* Gram negativas como *Myxococcus xanthus* y otras mixobacterias (*véase* Sección 12.17), así como especies de


(a) **Peritrica**

(b) **Polar: flagelos reversibles**

Polar: flagelos unidireccionales
Voltereta: los
flagelos se separan
(rotación en el
sentido de las
agujas del reloj)
Flagelos en penacho
(rotación contraria a las
agujas del reloj)
Flagelos en penacho (rotación
contraria a las agujas del reloj)
Rotación contraria
a las agujas del reloj
Rotación en el sentido
de las agujas del reloj
Rotación en el sentido
de las agujas del reloj
La célula
para y se
reorienta
Rotación en el sentido
de las agujas del reloj

Figura 4.43 Tipos de movimiento en procariotas con flagelación polar y peritrica. (a) Peritrica: el movimiento hacia delante se debe a la rotación de los flagelos en sentido contrario a las agujas del reloj. La rotación contraria, en el sentido de las agujas del reloj, origina una voltereta y luego, cuando vuelve a producirse una nueva rotación contraria a las agujas del reloj, la célula se desplaza en una nueva dirección. (b) Polar: las células cambian de sentido mediante inversión de la rotación flagelar, o bien, en el caso de flagelos unidireccionales mediante paradas periódicas que permiten la reorientación y luego el movimiento hacia delante por rotación de los flagelos en el sentido de las agujas del reloj. La flecha amarilla indica en cada caso el sentido del desplazamiento de la célula.

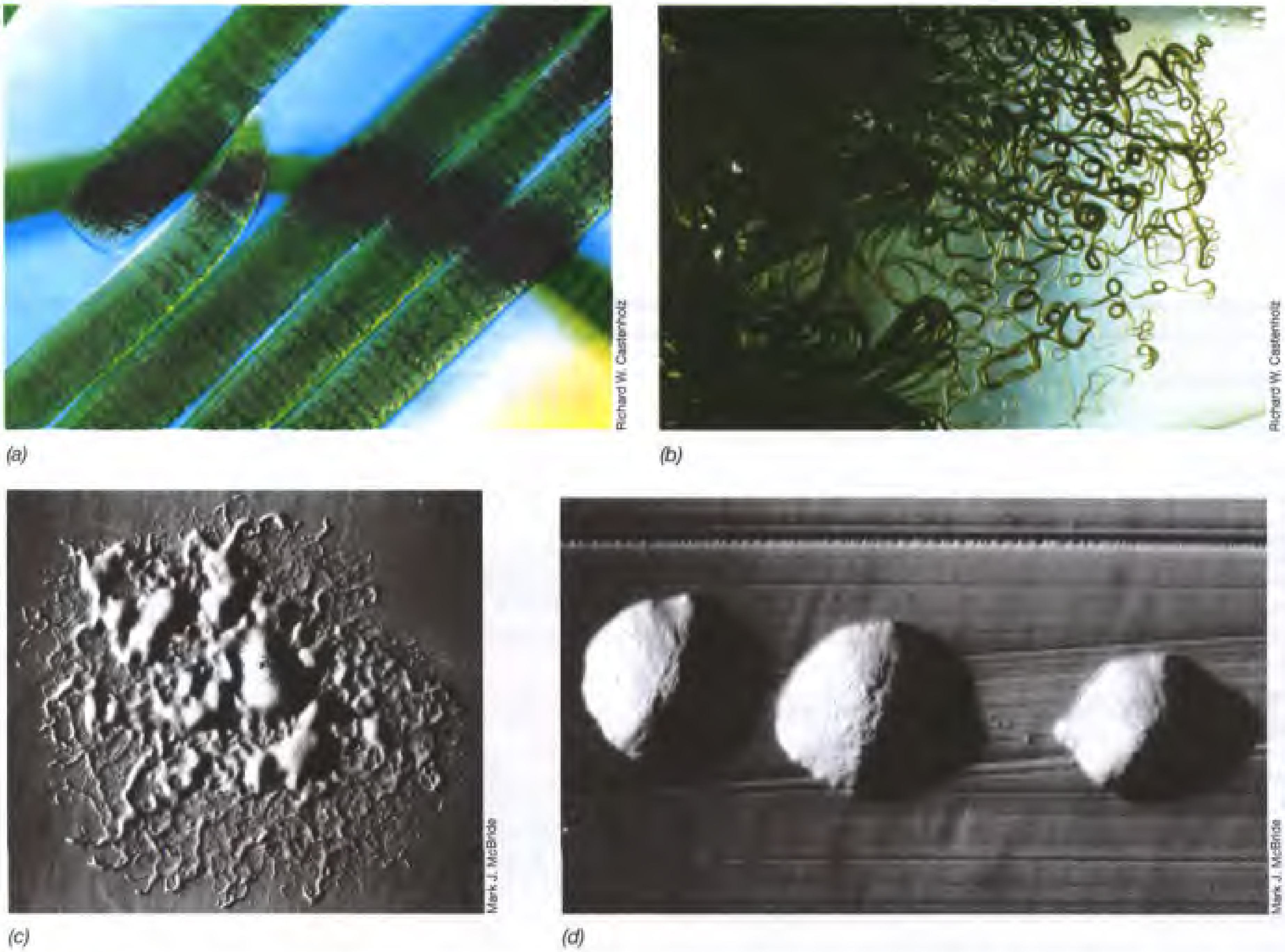


Figura 4.44 Bacterias deslizantes. (a, b) La bacteria filamentosa de gran tamaño *Oscillatoria princeps*. (a) Micrografía, donde cada célula tiene unos 35 mm de ancho. (b) Fotografía de filamentos deslizándose sobre una capa de agar. Las células se desplazan por deslizamiento sobre una superficie sólida y los filamentos pueden utilizar un segundo filamento como superficie sólida para el deslizamiento. (c, d) La bacteria deslizante Gram negativa *Flavobacterium johnsoniae*. (c) Masas de células desplazándose del centro de la colonia por deslizamiento (cada colonia mide unos 2,7 mm de ancho). (d) Una cepa mutante que no es deslizante muestra la morfología colonial típica de las bacterias no deslizantes (las colonias tienen un diámetro de 0,7-1 mm de diámetro). Para el mecanismo de deslizamiento que ha sido propuesto para *F. johnsoniae*, *véase* la Figura 4.45.

Cytophaga y *Flavobacterium* (*véanse* Figura 4.44*c*, *d* y Sección 12.31).

Mecanismo de la movilidad por deslizamiento

Aunque no se han identificado por completo los mecanismos del deslizamiento, se han propuesto modelos para el deslizamiento bacteriano y existen pruebas de que probablemente exista más de un mecanismo. En el caso de las cianobacterias (Figura 4.44*a*, *b*), se sabe que las células secretan un polisacárido mucoso sobre la superficie externa de la célula a medida que se deslizan. Esta sustancia mucosa parece estar en contacto tanto con la superficie celular como con la superficie sólida por la que la célula se desplaza; a medida que el polisacárido se va adhiriendo a la superficie la célula se desplaza por tracción. Esta hipótesis se apoya en la observación de que existen poros secretores de esta sustancia viscosa en la superficie de varias cianobacterias filamentosas.

Sin embargo, parece claro que la secrección de este material mucoso no es el mecanismo de deslizamiento en el caso de bacterias deslizantes que no son fototrofas. Por ejemplo, en el caso de *Flavobacterium johnsoniae* (Figura 4.45), el mecanismo responsable probablemente se deba al movimiento de proteínas de la superficie de la célula. En el modelo de *F. johnsoniae*, existen proteínas específicas ancladas en la membrana citoplasmática y en la membrana externa que se piensa que impulsan a la célula hacia delante por un mecanismo del tipo de cadena continua (Figura 4.45). El movimiento de las proteínas de la membrana citoplasmática probablemente se deba a la energía liberada por la fuerza motriz de protones (*véanse* Secciones 4.6 y 5.12), y éstas a su vez transmiten de algún modo esta energía a las proteínas de la membrana externa dispuestas en la superficie a modo de «correa sin fin» (Figura 4.45). Se interpreta que el movimiento de dicha cadena sobre la superficie sólida empuja literalmente a la célula hacia delante.

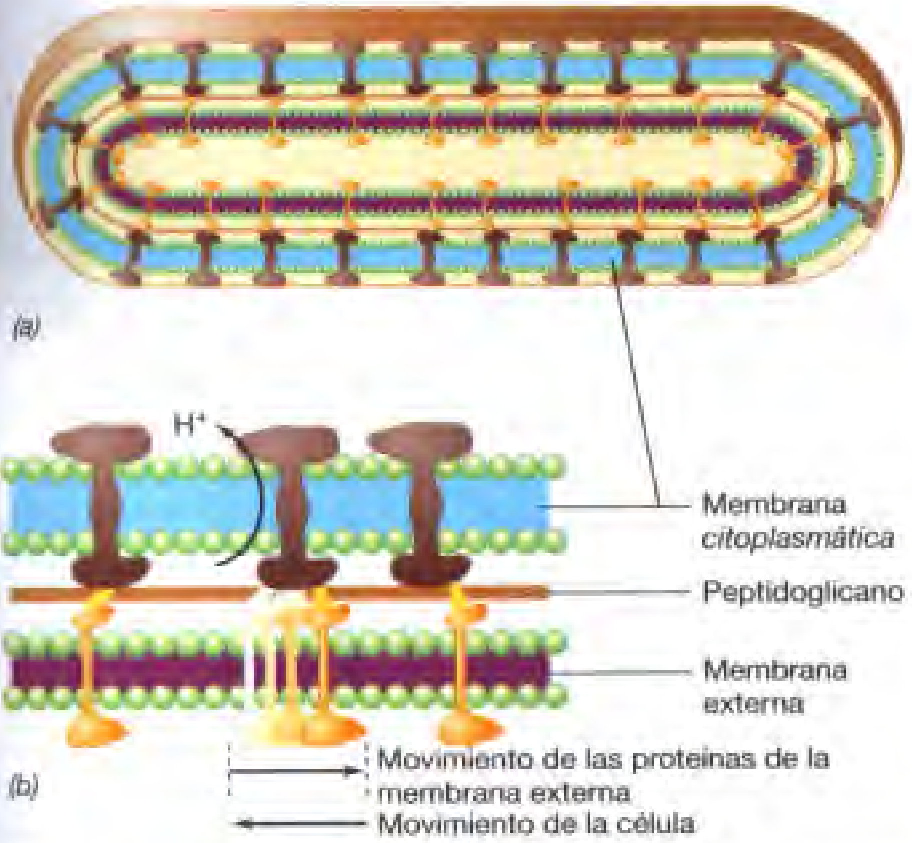


Figura 4.45 Modelo propuesto para la movilidad por deslizamiento en *Flavobacterium johnsoniae* y otras bacterias deslizantes (cedido por el Dr. Mark J. McBride). (a) Corte longitudinal de una célula Gram negativa mostrando las proteínas específicas de deslizamiento en la membrana *citoplasmática* y en la membrana externa. (b) Vista detallada. Se piensa que existen enganches (amarillo) en el peptidoglicano que conectan determinadas proteínas *citoplasmáticas* (marrón) a proteínas de la membrana externa (naranja), y las impulsan a lo largo de una superficie sólida. Adviértase el sentido diferente del movimiento de las proteínas de la membrana *citoplasmática* y de la célula impulsada.

Como otras formas de movilidad, el deslizamiento tiene una enorme importancia ecológica pues permite a la célula colonizar nuevos ambientes o interaccionar de modo beneficioso con otras células. A este respecto, es interesante señalar que las mixobacterias, que constituyen un ejemplo clásico de bacterias deslizantes, tienen un comportamiento social y un estilo de vida muy cooperativo donde la movilidad por deslizamiento favorece la interacción entre las células (*véase* Sección 12.17).

4.12 Respuestas sensoriales: quimiotaxis, fototaxis y otras taxias

Muchos procariotas, aunque no todos, son móviles y es razonable suponer que la movilidad supone una ventaja selectiva en ciertas condiciones. En la naturaleza, los procariotas se encuentran a menudo en presencia de *gradientes* de agentes físicos y químicos; y los mecanismos de movilidad en las células han evolucionado para responder a estos gradientes de modo positivo o negativo, dirigiendo el movimiento de la célula hacia la molécula que actúa como señal, o en sentido contrario. Esos movimientos dirigidos se denominan *taxias*, y en los microorganismos existe una gran variedad de respuestas de dicho tipo. La **quimiotaxis** es la respuesta a agentes químicos, y la **fototaxis** es la respuesta a la luz; ambos son dos ejemplos conocidos de taxias sobre los que nos centraremos con más detalle.

La quimiotaxis es un fenómeno que ha sido bastante bien estudiado en bacterias flageladas y, a nivel genético, se conocen los mecanismos por los que la maquinaria flagelar percibe la composición química del ambiente extracelular. Aquí nos referiremos únicamente a las bacterias flageladas. No obstante, algunas bacterias deslizantes también tienen movimientos quimiotácticos y fototácticos que, en el caso concreto de las cianobacterias filamentosas, se conocen desde hace mucho tiempo. Por tanto, al igual que como las bacterias flageladas, las bacterias deslizantes también poseen la capacidad de dirigir su maquinaria de movilidad, aunque por mecanismos aún desconocidos.

Quimiotaxis

Para comprender la quimiotaxis debemos centrar nuestra atención en el comportamiento de una sola célula bacteriana enfrentada a un gradiente químico de una sustancia atrayente (Figura 4.46). A diferencia de los organismos superiores, los procariotas son demasiado pequeños para captar la existencia de un gradiente a lo largo de su cuerpo. En vez de eso, al moverse deben comparar el estado físico o químico de su entorno con el que existía unos segundos antes. Dicho de otro modo, las bacterias son capaces de responder al *gradiente temporal* (más que al *espacial*) de las moléculas señalizadoras durante su movimiento.

La mayor parte de la investigación realizada sobre quimiotaxis se ha llevado a cabo utilizando la bacteria *Escherichia coli*, que presenta flagelación peritrica. En ausencia de un gradiente, las células de *E. coli* se mueven al azar y realizan **carreras** mediante las cuales las células se desplazan hacia delante de una forma suave; y también **volteretas**, mediante las cuales la célula se detiene y cambia de dirección girando al azar (Figura 4.46*a*). De este modo, mediante sucesivas carreras y volteretas, la célula se desplaza al azar por su entorno, sin ir realmente a ninguna parte concreta. Sin embargo, la presencia de un gradiente de una sustancia atrayente cambia este comportamiento de movimiento sin sentido. A medida que el organismo capta concentraciones más altas de la sustancia quimiotáctica, mediante el muestreo periódico de la concentración de la sustancia en el medio, las carreras son más frecuentes y las volteretas más escasas. El resultado neto de este comportamiento es que el organismo se desplaza por el gradiente de concentración hacia concentraciones más elevadas de la sustancia atrayente (Figura 4.46*b*). Si lo que el organismo detecta es una sustancia repelente opera el mismo mecanismo, aunque, en este caso, es la *disminución* de la concentración de repelente (en vez del *aumento*, como en el caso de una sustancia atrayente) lo que estimula la frecuencia de las carreras y favorece su alejamiento. En una carrera, el movimiento hacia delante se produce cuando el motor flagelar gira en el sentido contrario a las agujas del reloj. En cambio, cuando los flagelos giran en el sentido de las agujas del reloj, el penacho de flagelos se abre, cesa el movimiento hacia delante y tiene lugar una voltereta (Figura 4.43).

En el caso de las células con flagelación polar, la situación es algo diferente. Muchas bacterias con flagelos polares,

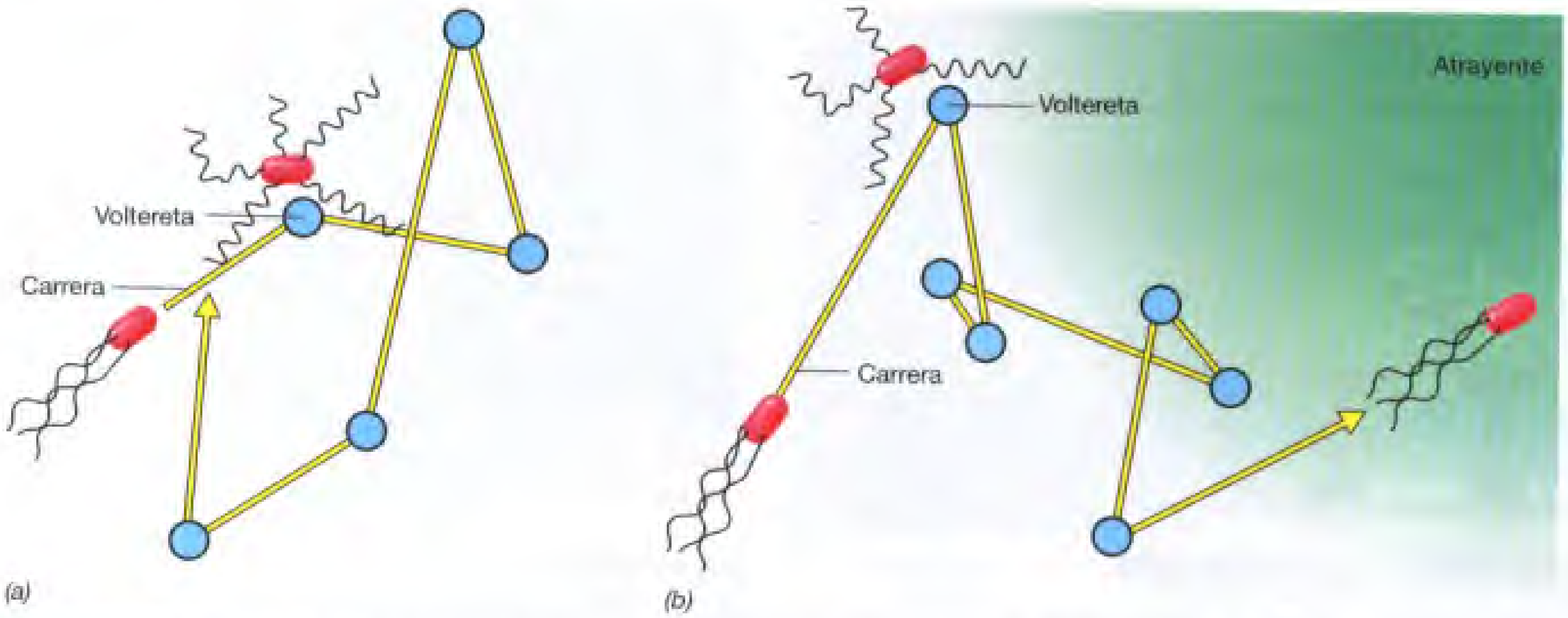


Figura 4.46 Quimiotaxis en una bacteria con flagelación peritrica como *Escherichia coli.* (a) En ausencia de un atrayente químico se desplaza al azar mediante carreras y cambia de dirección mediante volteretas. (b) En presencia de una sustancia atrayente, las carreras se favorecen y la célula se mueve en la dirección del gradiente positivo de la sustancia atrayente.

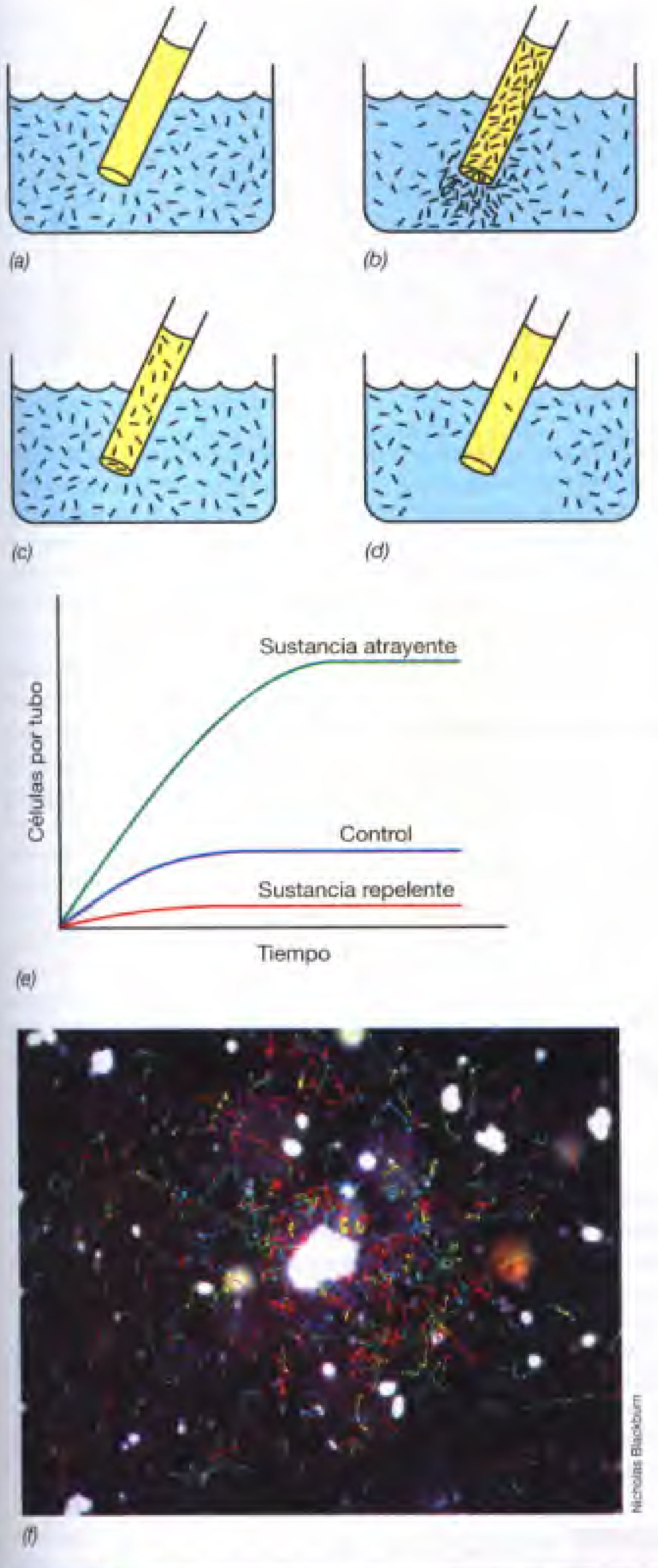
como las especies de *Pseudomonas*, son capaces de invertir el sentido de rotación de sus flagelos como lo hacen las células con flagelación peritrica invirtiendo de esta manera el sentido del desplazamiento (Figura 4.43*b*). No obstante, otras bacterias con flagelación polar, como la bacteria fototrofa *Rhodobacter sphaeroides*, sólo tienen flagelos que rotan en el sentido de las agujas del reloj. Cabe preguntarse si tales células pueden cambiar su trayectoria y si son quimiotácticas. La respuesta es afirmativa pues *R. sphaeroides*, que posee un único flagelo, detiene periódicamente la rotación de su flagelo y durante ese breve momento la célula se reorienta al azar por movimiento browniano. Cuando el flagelo comienza a girar de nuevo, la célula se desplaza en una nueva dirección (Figura 4.43*b*). De hecho, las células de *R. sphaeroides* son muy quimiotácticas frente a diversos compuestos carbonados, y también muestran taxias en respuesta al oxígeno y a la luz (*véase* más adelante la explicación de estas taxias). Aunque *R. sphaeroides* no puede invertir su motor flagelar, su quimiotaxis es, en cierto modo, similar a la de *E. coli*. Cuando el gradiente de una sustancia atrayente aumenta, *R. sphaeroides* tiende a mantener sus flagelos rotando; pero cuando el gradiente de una sustancia atrayente desciende o aumenta el gradiente de una repelente, las células se paran y reorientan su movimiento.

Medida de la quimiotaxis

El modo mediante el que una bacteria emplea los cambios temporales de concentración química para controlar la rotación del flagelo es complejo, e implica varios mecanismos reguladores a nivel genético y bioquímico. La explicación detallada de los mecanismos de la quimiotaxis se hará en el Capítulo 8 (*véase* Sección 8.11), pues este tema puede comprenderse mejor en el contexto bioquímico y genético que allí se expone. Por ahora, basta decir que los mecanismos moleculares de la quimiotaxia requiren proteínas sensoras que se sitúan en la membrana y que se denominan *quimiorreceptores*, capaces de captar el gradiente químico en función del tiempo y de interactuar con proteínas *citoplasmáticas* que condicionan la dirección de giro del motor flagelar. En definitiva, como la rotación del flagelo determina si la célula efectúa carreras o volteretas, la quimiotaxis puede considerarse como un *sistema de respuesta sensorial* que dirige la función flagelar y que se regula químicamente.

La demostración de la quimiotaxis bacteriana puede llevarse a cabo sumergiendo un pequeño capilar de vidrio, que contenga una sustancia quimiotáctica, en una suspensión de bacterias móviles que no contenga dicha sustancia. A partir de la punta del capilar se establece un gradiente en el medio, de tal modo que la concentración disminuye gradualmente a medida que aumenta la distancia a la punta del capilar (Figura 4.47*a*). Si el capilar contiene una sustancia atrayente, las bacterias se moverán hacia el capilar formando un enjambre alrededor del extremo abierto, y posteriormente muchas bacterias móviles se introducirán en el capilar (Figura 4.47*b*). Algunas bacterias se desplazarían dentro del capilar, incluso si contuviera una solución de la misma composición que el medio debido a movimientos al azar (Figura 4.47*c*). Sin embargo, si se trata de un compuesto atrayente, la concentración de bacterias dentro del capilar será varias veces mayor que la que se registra fuera del capilar. Por otra parte, si el capilar contiene una sustancia repelente, la concentración de bacterias dentro del capilar resultará mucho menos que la de afuera (Figura 4.47*d*). Mediante estos métodos tan sencillos, es posible investigar las diversas sustancias químicas que muestran propiedad de atracción o repulsión para una bacteria determinada.

La quimiotaxis también puede estudiarse microscópicamente. Utilizando una cámara de vídeo que capte la posición de las bacterias a distintos tiempos y marque la trayectoria de cada célula es posible visualizar este fenómeno (Figura 4.47*f*). Este método ha sido adaptado a los



Nicholas Blackburn

Figura 4.47 Técnicas para medir la quimiotaxis en bacterias. (a) Inserción de un capilar en una suspensión bacteriana. Cuando se inserta el capilar, comienza la formación del gradiente. (b) Acumulación de bacterias en el capilar que contiene una sustancia atrayente. (c) Capilar control que contiene una solución salina que ni atrae ni repele. La concentración de células dentro del capilar es la misma que en el exterior. (d) Repulsión de bacterias por una sustancia repelente. (e) Cinética temporal que muestra el número de células en capilares con distintas sustancias. (f) Huellas de bacterias móviles en agua marina en las proximidades de una célula de un alga (mancha blanca en el centro) detectadas mediante un sistema con videocámara acoplado a un microscopio. Adviértase cómo las células responden positivamente al oxígeno (aerotaxis) que el alga produce mediante fotosíntesis. La velocidad media de las células fue de 25 μm/s. El alga tiene unos 60 μm de diámetro.

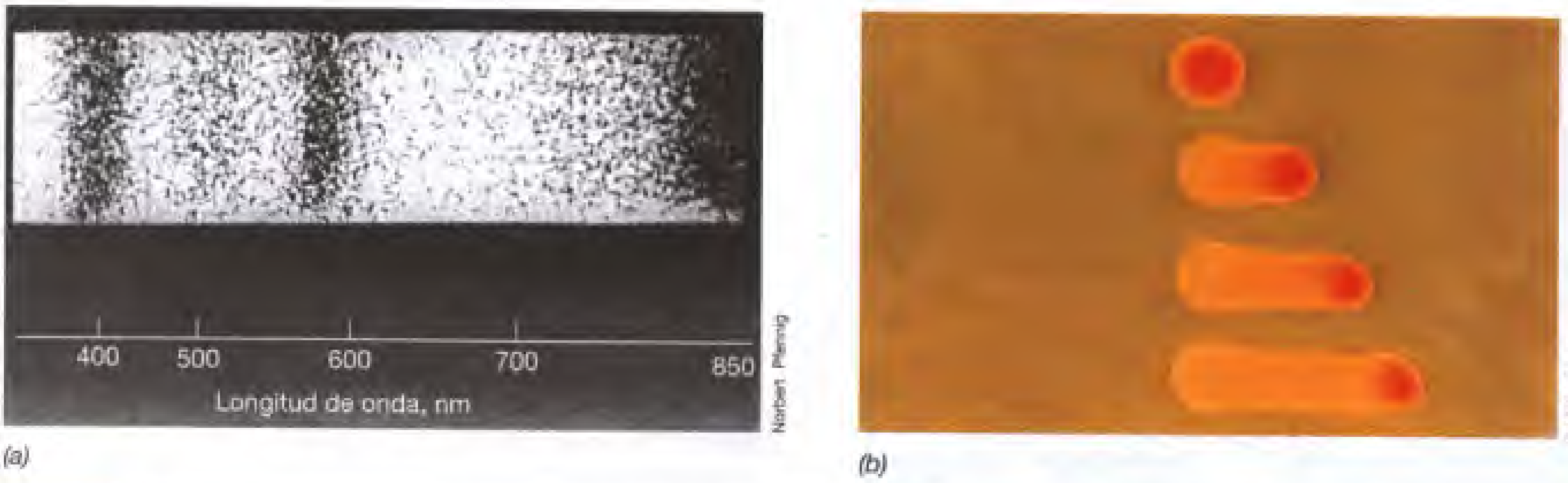
estudios de bacterias quimiotácticas en medios naturales. Se piensa que en la naturaleza los principales agentes quimiotácticos para las bacterias son los nutrientes secretados por células microbianas de mayor tamaño, tales como los protozoos o las algas (Figura 4.47*f*), o por los macroorganismos vivos o muertos.

Fototaxis

Muchos microorganismos fototróficos se mueven hacia la luz, un proceso que se denomina *fototaxis*. La fototaxis tiene la ventaja de permitir que un microorganismo fototrófico se oriente adecuadamente para poder realizar una fotosíntesis más eficaz. Esto puede verse con facilidad si se hace incidir un espectro de luz a través de una preparación microscópica en un porta donde existen bacterias fototróficas móviles; las bacterias se acumulan en aquellas longitudes de onda en las que sus pigmentos fotosintéticos son capaces de captar la energía de la luz (Figura 4.48*a*) (*véanse* Secciones 17.2 y 17.3 para una descripción de los pigmentos fotosintéticos).

Se han descubierto dos taxias distintas en los procariotas fototróficos. Una, denominada *escotofobotaxis*, que puede odservarse sólo microscópicamente, se produce cuando una bacteria fototrófica se desplaza por azar fuera del campo de iluminación del microscopio hacia la oscuridad. La entrada en la zona de oscuridad afecta al estado energético de la célula, y esto determina que la célula realice una voltereta, invierta la dirección, y de nuevo se desplace en una carrera, volviendo así a entrar de nuevo en la luz.

Además de la escotofobotaxis, los microorganimos fototróficos llevan a cabo la fototaxis propiamente dicha, es decir, un movimiento dirigido a favor de un gradiente de luz hacia zonas de intensidad luminosa creciente. Este fenómeno es similar a una quimiotaxis positiva, excepto que en este caso el atrayente no es una sustancia química sino la luz. En algunas especies, tales como el fototrofo *Rhodospirillum centenum*, que es muy móvil (*véase* Figura 4.39), las *colonias enteras* muestran quimiotaxis desplazándose al unísono hacia la luz (*véase* Figura 4.48*b*). Aunque todavía no se conocen los mecanismos moleculares de la fototaxis, parece evidente que algunos componentes del sistema de regulación que controla la quimiotaxis participan también en la fototaxis. En particular, en ambos casos intervienen las proteínas *citoplásmicas* que controlan la dirección de rotación de los flagelos (las proteínas Che) (*véase* Sección 8.11). Esta evidencia proviene de los estudios realizados con mutantes de bacterias fototróficas deficientes en fototaxis; tales mutantes también son frecuentemente defectivos en quimiotaxis. El responsable de la orquestación de la respuesta fototáctica es un *fotorreceptor*, análogo al quimiorreceptor pero capaz de detectar un gradiente de *luz* en vez de un



(a) (b)

Figura 4.48 Fototaxis. (a) Acumulación escotofóbica de la bacteria fototrofa *Thiospirillum jenense* a longitudes de onda a las que sus pigmentos absorben la energía luminosa. Un espectro de luz ilumina un porta con una suspensión densa de bacterias y, tras un tiempo, se produce un acúmulo selectivo de bacterias. Las longitudes de onda a las que se producen los acúmulos son precisamente aquellas a las que la bacterioclorofila *a* es capaz de absorber (compare con Figura 17.3*b*). (b) Fototaxis de una colonia completa de la bacteria roja fototrofa *Rhodospirillum centenum* en un intervalo de 2 horas (tiempo cero, en la parte superior). Estas células, que son intensamente fototácticas, se desplazan de modo simultáneo hacia la derecha, que es donde está situada la fuente de luz. Véase una micrografía electrónica de células de *R. centenum* en la Figura 4.39.

gradiente químico. Se cree que el fotorreceptor interacciona de algún modo con las proteínas que controlan la rotación de los flagelos, a fin de mantener la célula en un movimiento de carrera si se encuentra desplazándose hacia una intensidad de luz creciente.

Otras taxias

Una vez dilucidados los principios generales de los sistemas de respuesta sensorial, fundamentalmente a partir del estudio de la quimiotaxis, se están empezando a comprender ahora otras taxias en bacterias, como el movimiento de acercamiento o alejamiento al oxígeno (*aerotaxia, véase* Figura 4.47*f*) o el de aproximación o huida de condiciones ambientales de elevada fuerza iónica (*osmotaxis*). En la mayoría de estos casos existe un mecanismo común: las células muestrean periódicamente su microambiente y procesan esta información a través de una vía de transducción de señales (*véase* Sección 8.11) que controla la dirección de la rotación del flagelo. Esto puede considerarse como un tipo simple de respuestas sensoriales, y una base teórica para exclarecer los mecanismos moleculares de las taxias bacterianas es profundizar en el conocimiento de otras respuestas similares en organismos superiores, como por ejemplo la transmisión nerviosa. Desde el punto de vista del comportamiento, puede decirse que los procariotas móviles se adaptan al estado químico y físico de su entorno y pueden acercarse o alejarse de ciertos estímulos, quizá como un medio de competir con éxito en la lucha por la supervivencia.

✓ *4.11-4.12 Revisión de conceptos*

Algunas bacterias son móviles por deslizamiento y otras por flagelos. Las bacterias móviles pueden responder a gradientes físicos y químicos del medio ambiente. En los procesos de quimiotaxis y fototaxis, el movimiento aleatorio de una célula procariótica puede dirigirse a favor o en contra de una sustancia (o a favor o en contra de la luz, en el caso de un microorganismo fototrofo) mediante el control de las frecuencias con que ocurren las carreras y las volteretas. El movimiento está controlado por la dirección de rotación del flagelo, que a su vez depende de un conjunto de proteínas sensoras y de respuesta.

- ✓ ¿En qué se diferencian la movilidad por *deslizamiento* y la movilidad por *desplazamiento en medio líquido*, en cuanto a los mecanismos y requerimientos?
- ✓ Defina el término *quimiotaxis*.
- ✓ ¿Qué origina una *carrera* y qué origina una *voltereta*?
- ✓ ¿En qué difiere la *escotofobotaxis* de la *fototaxis*?

IV ESTRUCTURAS DE SUPERFICIE E INCLUSIONES DE PROCARIOTAS

Además de las paredes celulares y de las capas de superficie relacionadas, consideradas anteriormente en este capítulo, algunos procariotas tienen otras capas más externas que contactan con el medio. Además, la mayoría de las células pueden formar inclusiones celulares de uno u otro tipo. Normalmente, estas inclusiones suelen estar formadas por algún nutriente abundante en el entorno, que luego puede ser utilizado para sobrevivir en periodos de escasez de nutrientes. En esta sección, examinaremos algunas de estas estructuras.

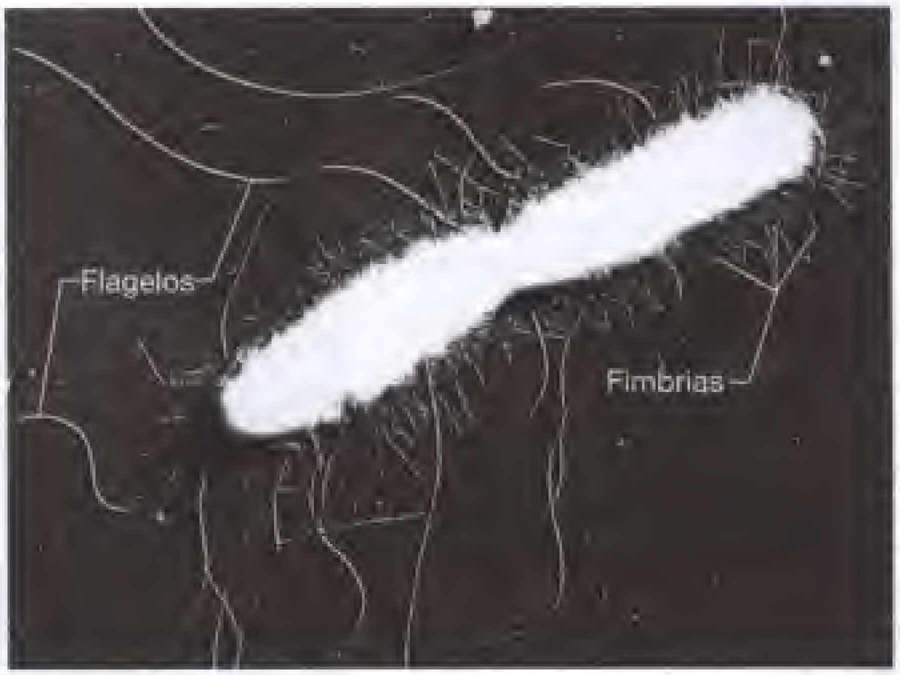
4.13 Estructuras de la superficie bacteriana e inclusiones celulares

Los procariotas pueden producir muchas estructuras unidas a la superficie celular o que emergen de alguna manera de ella. No todas las bacterias contienen tales estructuras y, por tanto, son formaciones *opcionales*, producidas por algunas clases de procariotas pero no por otras.

Fimbrias y pelos

Las *fimbrias* y los *pelos* (*pili*) presentan una estructura similar a la de los flagelos pero no confieren movilidad. Las **fimbrias** son considerablemente más cortas que los flagelos y mucho más numerosas (Figura 4.49), pero al igual que los flagelos son de naturaleza proteica. No se conoce con certeza la función de las fimbrias, aunque existen evidencias que indican que en algunos organismos favorecen la fijación a las superficies, como por ejemplo la fijación a tejidos animales en el caso de algunas bacterias patógenas, o bien la formación de películas o biofilms sobre superficies líquidas (*véase* Sección 19.3).

Los **pelos** o **pili** son estructuralmente similares a las fimbrias pero por lo general son más largos, y solamente existen unos pocos sobre la superficie de las células. Los pelos pueden verse con el microscopio electrónico y funcionan como receptores específicos para algunos tipos de virus, por lo que pueden observarse fácilmente cuando están cubiertos de virus (Figura 4.50). También es evidente que los pelos participan en el proceso de la conjugación, como se discutirá en la Sección 10.9. Los pelos contribuyen igualmente a la fijación de algunas bacterias patógenas a los tejidos humanos.



J. P. Duguid and J. F. Wilkinson

Figura 4.49 Micrografía electrónica de una célula de *Salmonella typhi* en división, mostrando fiambrias y flagelos. Cada célula tiene unos 0,9 μm de diámetro.

Capas superficiales paracristalinas (capas S)

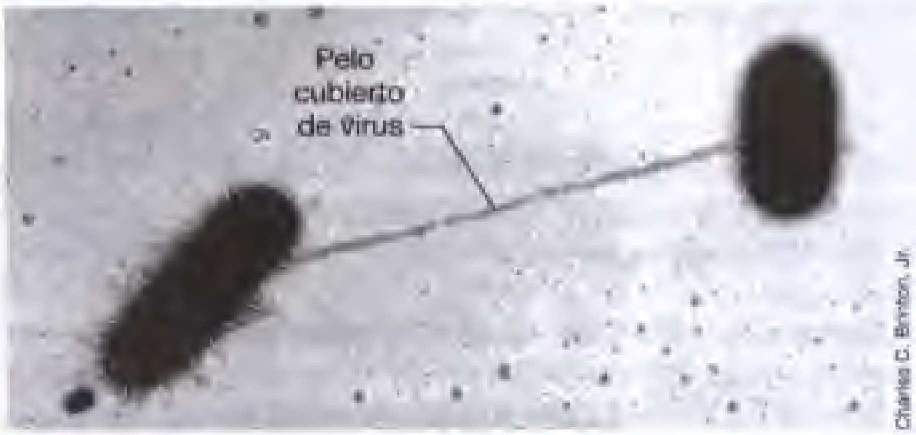
Muchos procariotas contienen una capa en la superficie celular formada por proteínas en disposición bidimensional. Estas capas se denominan *capas S*. Tales formaciones se han detectado en representantes de prácticamente todos los grupos filogenéticos de *Bacteria* y su presencia es casi universal en el dominio *Archaea*. En algunas especies de estas últimas, la capa S actúa también de pared celular (*véase* Sección 4.8). La capa S tiene una apariencia cristalina y adopta disposiciones de simetría variadas, como hexagonal, tetragonal o trimérica, dependiendo del número y estructura de las subunidades proteicas o glicoproteicas que la forman. La Figura 4.34*b* muestra una micrografía electrónica de una capa S.

Se desconoce la función principal de las capas S. Como representa una zona de interfase entre la célula y su entorno, es probable que en las células que posean capa S funcione como una barrera de permeabilidad externa, permitiendo el paso de sustancias de bajo peso molecular y excluyendo moléculas grandes. Además, en las bacterias patógenas las capas S pueden actuar como elementos de protección frente a ciertos mecanismos de defensa del hospedador.

Cápsulas y capas mucosas: el glicocálix

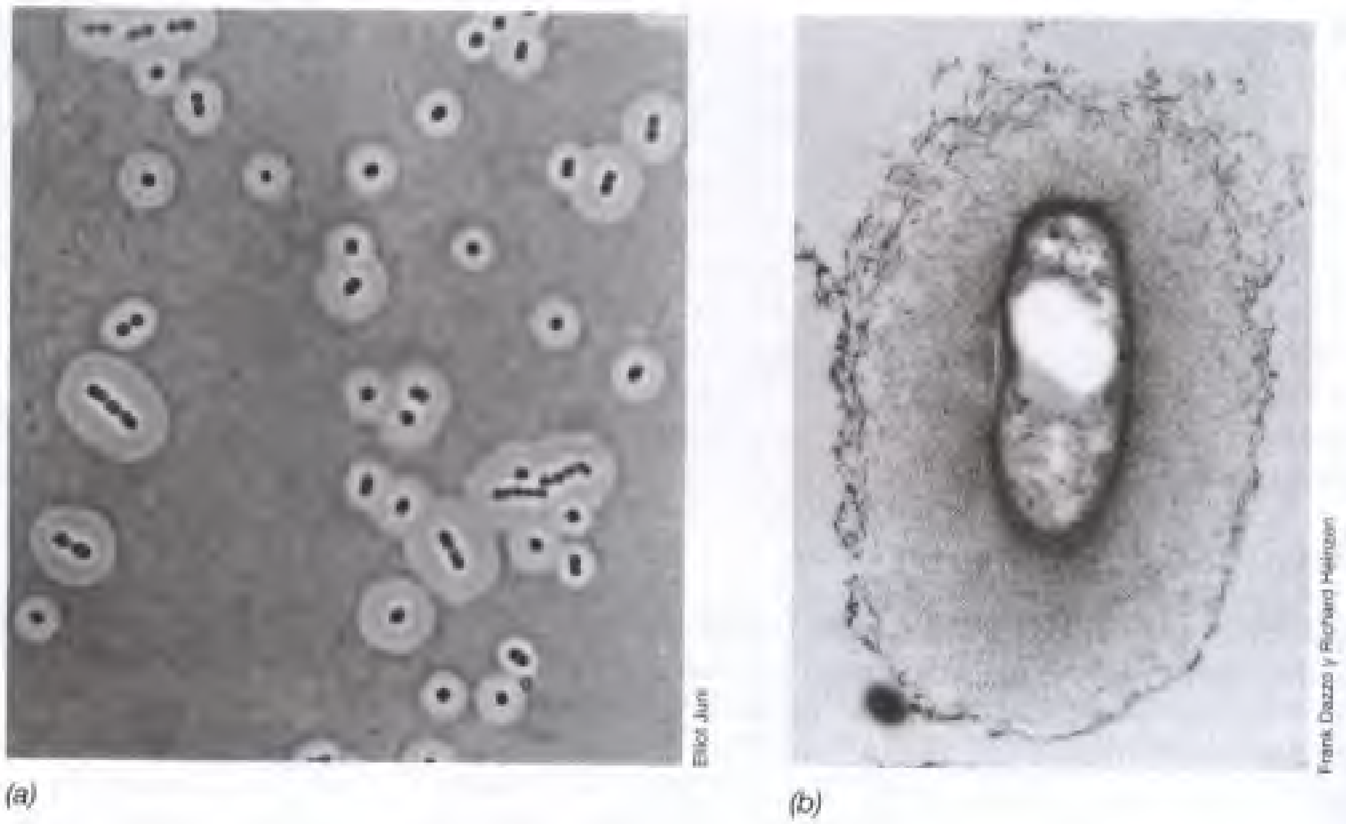
En muchos casos, los organismos procarióticos secretan en su superficie materiales viscosos y pegajosos (Figura 4.51). Estos materiales suelen ser polisacáridos, y en algunos casos proteínas. En ocasiones se emplea el término **cáspsula** o **capa mucosa** para describir esta capa de polisacárido, y también se utiliza el término **glicocálix** como designación más amplia. El glicocálix se define como el material polisacarídico que se extiende alrededor de la célula. La composición de estas capas varía en los diferentes organismos y puede ser gruesa o fina, rígida o flexible, dependiendo de la naturaleza química en cada organismo determinado. Las capas rígidas se organizan como una matriz impermeable que excluye algunos colorantes, tales como la tinta china, y constituyen lo que se suele denominar *cápsula* (Figura 4.51*a*). Si el glicocálix se deforma fácilmente, no excluye partículas y es más difícil de visualizar, se denomina entonces *capa mucosa*.

El glicocálix desempeña varias funciones en las bacterias. Las capas de polisacárido externo son importantes en la *adherencia* o fijación de algunos microorganismos patógenos a sus hospedadores. Como se comentará en la Sección 21.6, la entrada de microorganismos patógenos en el cuerpo del hospedador se realiza normalmente a través de vías específicas, debido a la existencia de fenómenos de interacción superficial entre los componentes más externos de la célula (como el glicocálix) y del tejido del hospedador. El glicocálix tiene también otras funciones. Se ha visto que las bacterias con cápsula resisten mejor la acción de las células fagocitarias del sistema inmunitario (*véase* Sección 22.2). Además, como las capas de polisacárido probablemente retienen una cantidad importante de agua, se piensa que el glicocálix puede contribuir a la resistencia y a la desecación.



Charles C. Brinton, Jr.

Figura 4.50 La presencia de los pelos (pili) en una célula de *Escherichia coli* se evidencia mediante virus que se adhieren específicamente a los pili. La célula tiene unos 0,8 μm de diámetro.



Eliot Juni

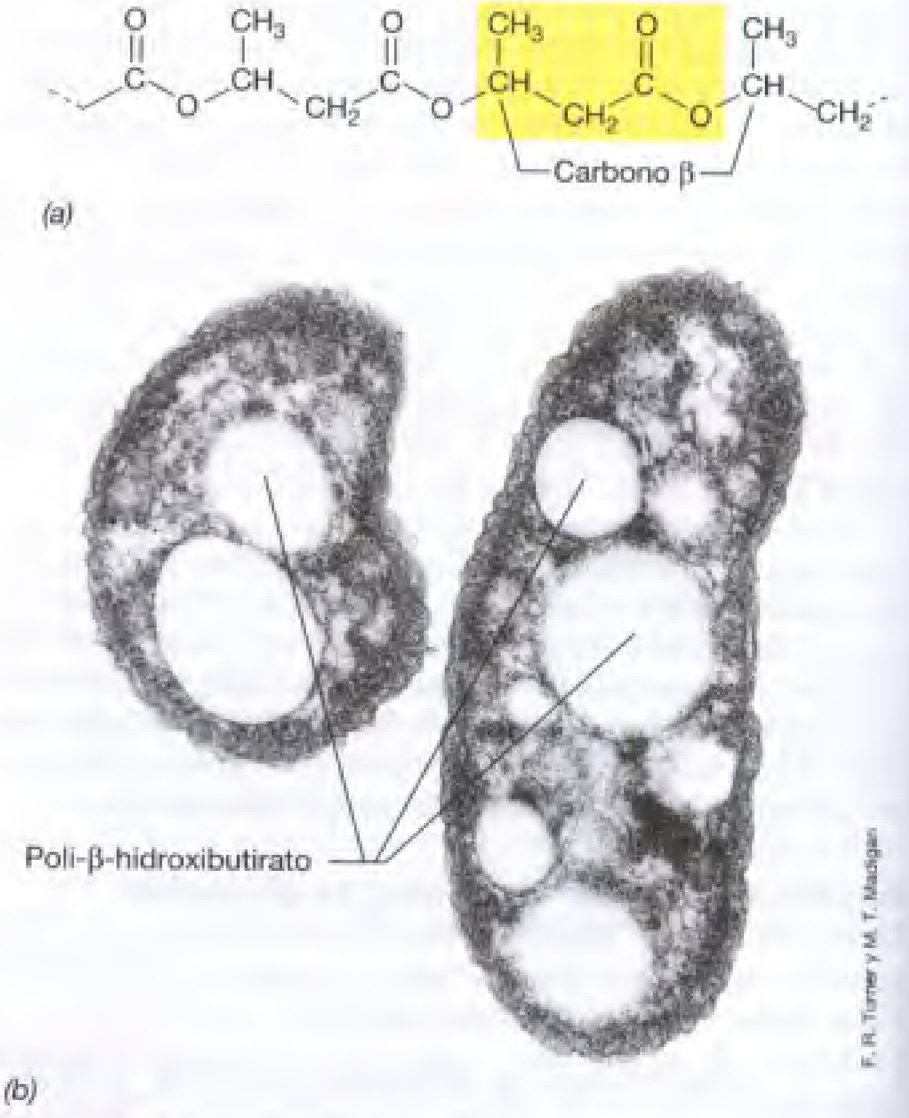
Frank Dazzo y Richard Heinzen

Figura 4.51 Cápsulas bacterianas. (a) Demostración de la presencia de cápsula en especies de *Acinetobacter* por tinción negativa con tinta china y observación por microscopía de contraste de fases. La tinta china no penetra la cápsula, de modo que su contorno queda revelado como una estructura más clara sobre un fondo oscuro. (b) Micrografía electrónica de un corte fino de una célula de *Rhizobium trifolii* teñida con rojo de rutenio para visualizar la cápsula. El diámetro de la célula sin contar con la cápsula es de unos 0,7 μm. Aunque la mayoría de las cápsulas están compuestas por polisacárido, algunas bacterias poseen cápsulas de proteínas. Las células de *Bacillus anthracis*, por ejemplo, un organismo asociado a la producción de enfermedad en animales y al bioterrorismo (*véase* Sección 25.11), contiene una cápsula de ácido poli-D-glutámico que protege a las células de la destrucción por las defensas del hospedador.

Polímeros carbonados de reserva

En el interior celular se observan a menudo gránulos y otras inclusiones. La naturaleza de estas inclusiones varía según los distintos organismos, pero en general su función es almacenar energía o actuar como reserva de los precursores estructurales necesarios para la síntesis de las macromoléculas. Las inclusiones se pueden observar directamente con el microscopio de contraste de fases, pero su contraste se puede aumentar mediante colorantes. Las inclusiones también se observan muy bien por microscopía electrónica (Figura 4.52). La mayoría de las inclusiones están rodeadas por una fina membrana que consta sólo de una monocapa de lípidos que aislan la inclusión del citoplasma propiamente dicho, por lo que no tiene la estructura típica de una unidad de membrana.

Una de las inclusiones más comunes entre los procariotas consta de **ácido poli-β-hidroxibutírico (PHB),** un compuesto lipídico formado por unidades de ácido β-hidroxibutírico (Figura 4.52*a*). Los monómeros de este ácido se unen por enlaces éster hasta formar largos polímeros de PHB cuyas moléculas se agregan formando gránulos (Figura 4.52*b*). La longitud de estos polímeros varía considerablemente desde 4 unidades hasta 18 unidades en algunos microorganismos. Se ha acuñado el término general de *poli-β-hidroxialkanoatos* (PHA) para describir esta clase colectiva de polímeros que pueden actuar como reserva de carbono y energía. Muchos procariotas, tanto pertenecientes al dominio *Bacteria* como *Archaea*, producen PHAs. Otro producto de reserva que los procariotas pueden sintetizar es el **glucógeno**, un polímero de glucosa (*véase* Sección 3.3 y Figura 3.6). Como los PHAs, el glucógeno es un depósito de carbono y energía que se acumula cuando la fuente de carbono está en exceso en el medio.



F. R. Turner y M. T. Madigan

Figura 4.52 Poli-β-hidroxibutirato (PHB). (a) Estructura química del PHB, un poli-β-hidroxialcanoato muy común. Se indica cada unidad monomérica. En otros polímeros de alcanoatos, el grupo —CH_3 sobre el carbono se sustituye por cadenas hidrocarbonadas más largas. (b) Micrografía electrónica de cortes finos de la bacteria fototrofa *Rhodovibrio sodomensis* mostrando gránulos de PHB.

Otras inclusiones y sustancias de reserva

Muchos microorganismos acumulan grandes reservas de fosfato inorgánico en forma de gránulos de **polifosfato**. Estos gránulos pueden degradarse y utilizarse como fuente de fosfato para la síntesis de ácidos nucleicos y de fosfolípidos, y para sustentar el crecimiento. Además, algunos procariotas son capaces de oxidar compuestos reducidos del azufre, como sulfuros y tiosulfatos. Estas oxidaciones están ligadas a reacciones metabólicas que producen energía (*véanse* Secciones 17.8 y 17.10) o a procesos de biosíntesis (*véase* Sección 17.6), pero en ambos casos se puede acumular dentro de las células el **azufre elemental** resultante en forma de grandes gránulos visibles (Figura 4.53). Los gránulos de azufre elemental se forman mientras compuestos de azufre reducido están todavía presentes en el medio. No obstante cuando la fuente se azufre reducido llega a ser limitante, los gránulos de azufre se oxidan, generalmente a sulfatos, y desaparecen lentamente a medida que se produce esta reacción.

Los **magnetosomas** son partículas cristalinas intracelulares del mineral de hierro magnetita, Fe_3O_4 (Figura 4.54). Los magnetosomas convierten a las células que los poseen en un dipolo magnético permanente sometido a la influencia de cualquier campo magnético. Las bacterias que producen estas inclusiones poseen *magnetotaxis*, proceso mediante el que se orientan y se deplazan siguiendo las líneas de un campo magnético (*véase* Sección 12.14). Aunque en el término *magnetotaxis* aparece el sufijo *-taxis*, no hay pruebas de que las bacterias magnetotácticas utilicen los sistemas sensores propios de las bacterias quimiotácticas o fototácticas (*véanse* Secciones 4.12 y 8.11). El alineamiento de los magnetosomas en la célula, les confiere simplemente propiedades magnéticas que permiten su orientación en una dirección particular de movimiento. Se han descrito magnetosomas en muchas especies acuáticas de *Bacteria* (Figura 4.54*a*). La mayoría crecen mejor a con-

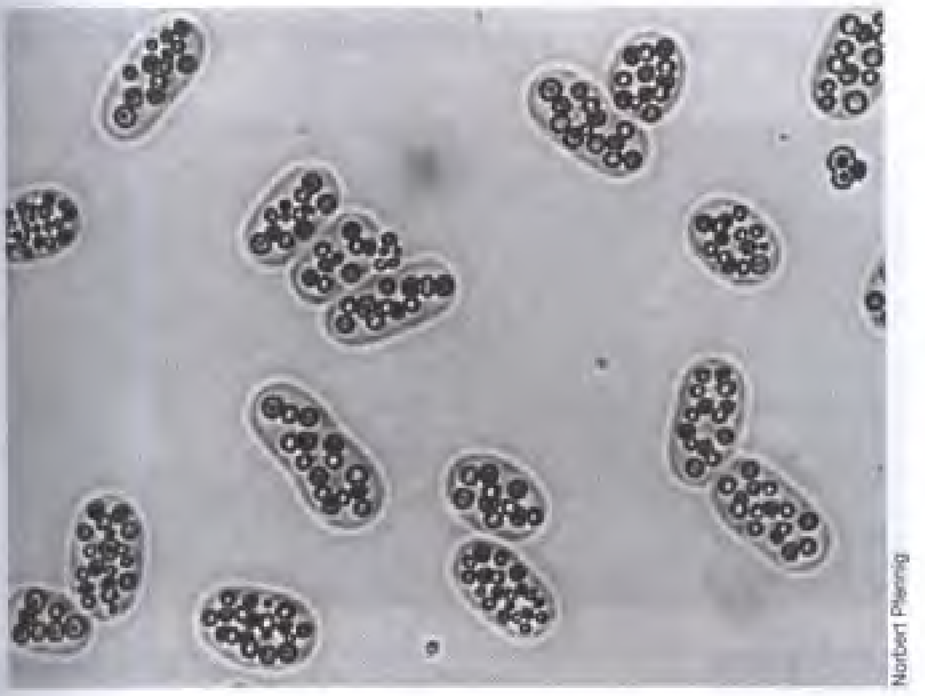
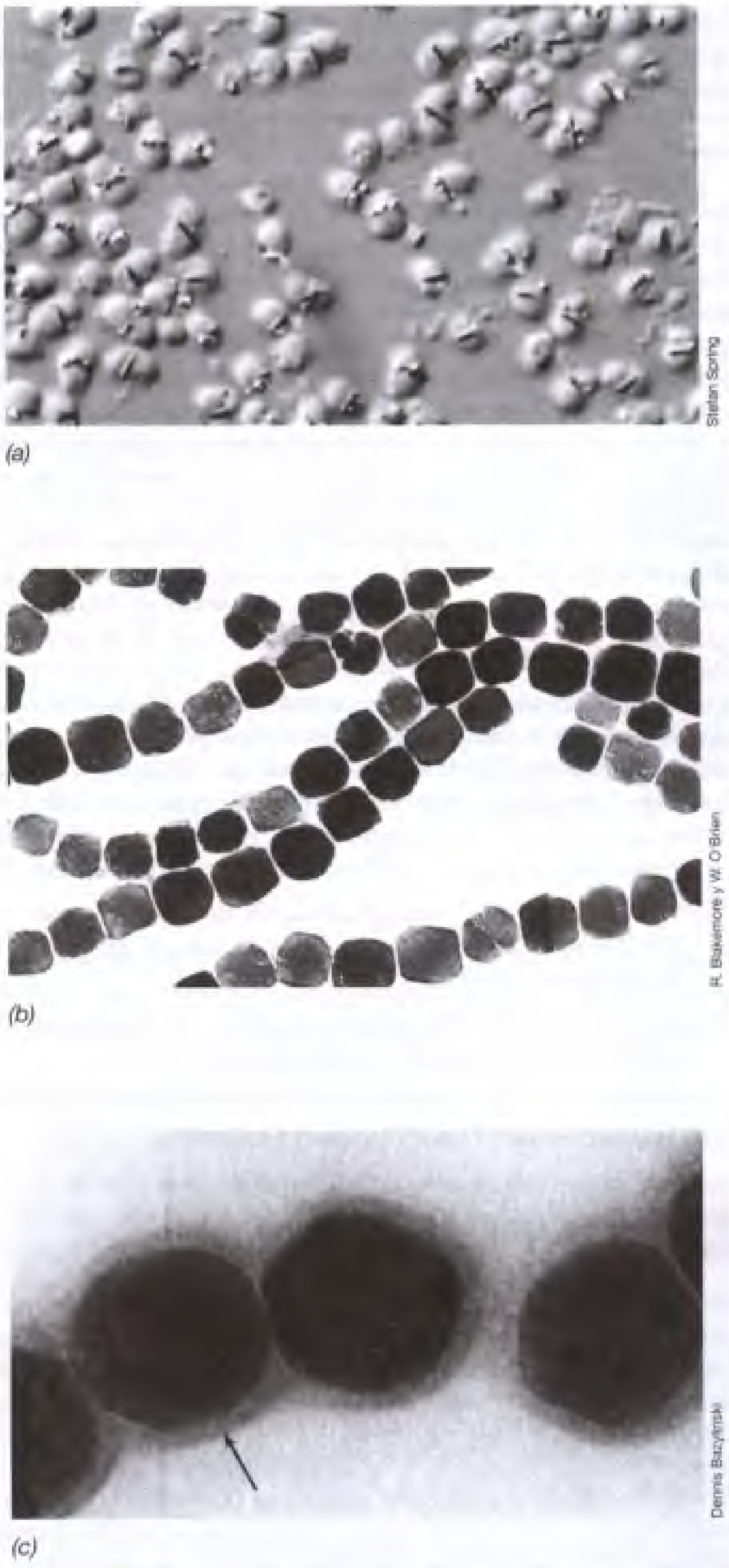

Norbert Pfennig

Figura 4.53 Micrografía en campo claro de células de la bacteria roja del azufre Iso*chromatium buderi*. Obsérvense los glóbulos de azufre en el interior de la célula. Una célula individual mide aproximadamente 4 × 7 µm.


Stefan Spring

(a)

R. Blakemore y W. O'Brien

(b)

Dennis Bazylinski

(c)

Figura 4.54 Bacterias magnetotácticas y magnetosomas. (a) Micrografía de contraste interferencial de bacterias magnetotácticas cocoides con magnetosomas. Cada célula mide 2,2 µm de diámetro. (b) Magnetosomas aislados de la bacteria *Magnetospirillum magnetotacticum*. Cada partícula tiene una longitud de unos 50 nm (*véase* Figura 12.32). (c) Micrografía electrónica de alto aumento de los magnetosomas de una bacteria magnetotáctica cocoide. La flecha señala la membrana que rodea cada magnetosoma. Cada magnetosoma es aquí de unos 90 nm de ancho. Aunque la membrana del magnetosoma contiene lípidos y proteínas, como la membrana del PHB (*véase* Figura 4.52) es una monocapa y no una auténtica «unidad» de membrana.

centraciones de oxígeno muy bajas, lo que parece indicar que probablemente una de sus funciones esenciales sea la de guiar a las células acuáticas hacia el fondo, junto a los sedimentos, donde las concentraciones de oxígeno son menores.

Los magnetosomas se hallan rodeados de una membrana que contiene fosfolípidos, proteínas y glicoproteínas (Figura 4.54*b*, *c*). Esta membrana no es una unidad de membrana, como lo es la membrana citoplasmática (Figura 4.17) sino una monocapa de membrana, como la que rodea los gránulos de poli-β-hidroxibutirato (PHB, Figura 4.52). Es posible que las proteínas de la membrana del magnetosoma favorezcan la precipitación del Fe^{3+} (captado por la célula en forma soluble por la acción de agentes quelantes) hasta Fe_3O_4. La morfología de los magnetosomas parece ser específica de cada especie, y la forma puede ser cuadrada, rectangular o acicular dependiendo de las especies bacterianas (Figura 4.54).

✓ 4.13 Revisión de conceptos

Con frecuencia, los procariotas contienen estructuras variadas que emergen de la célula o que se presentan en su interior. Entre ellas se encuentran las fimbrias, los pili, las capas S, las cápsulas o capas mucosas, polímeros de reserva y magnetosomas. Sin embargo, a diferencia de los orgánulos de las células eucarióticas, estas estructuras no están rodeadas por una unidad de membrana típica.

- ✓ ¿En qué se diferencian las fimbrias de los pili, en cuanto a su estructura y función?
- ✓ ¿Qué es el *poli-β-hidroxibutirato* y cuál es su función? ¿En qué condiciones se sintetiza este material?
- ✓ ¿Qué son los *magnetosomas*, cuál es su función y qué propiedad adquieren las células que los contienen?

4.14 Vesículas de gas

Numerosos procariotas que flotan en los lagos y en el mar poseen **vesículas de gas** que son las responsables de la flotabilidad de estas células. Las vesículas de gas representan una forma de movilidad que permite que las células floten dentro del agua a diferentes alturas, en función de los factores microambientales. Los ejemplos más llamativos de flotación debida a estas estructuras se observan en las cianobacterias que se acumulan masivamente en los lagos (Figura 4.55). Las células con vesículas de gas ascienden a la superficie del lago y se acumulan por el viento en densas masas. Las vesículas de gas también se encuentran en algunas bacterias fototrofas rojas y verdes (*véanse* Secciones 12.2 y 12.32), así como en bacterias no fototrofas que viven en lagos y estanques. Algunas *Archaea* también contienen vesículas de gas.

Estructura de las vesículas de gas

Las vesículas de gas son estructuras fusiformes, huecas pero rígidas, de longitud y diámetro variable. La longitud de las vesículas de gas varía de 300 a más de 1.000 nm y la anchura de 45 a 120 nm, pero estos parámetros son constantes para cada organismo. Se localizan en el citoplasma en número variable, desde unas cuantas por célula hasta varios centenares. La membrana de las vesículas de gas se compone sólo de proteínas, tiene unos 2 nm de espesor y es impermeable al agua y a solutos, pero permeable a los gases; por tanto, aparecen como estructuras llenas de gas rodeadas por los constituyentes del citoplasma (Figura 4.56). La presencia de vesículas de gas puede detectarse por microscopía óptica, donde los grupos de vesículas aparecen como inclusiones brillantes irregulares, o por microscopía electrónica (Figura 4.57).

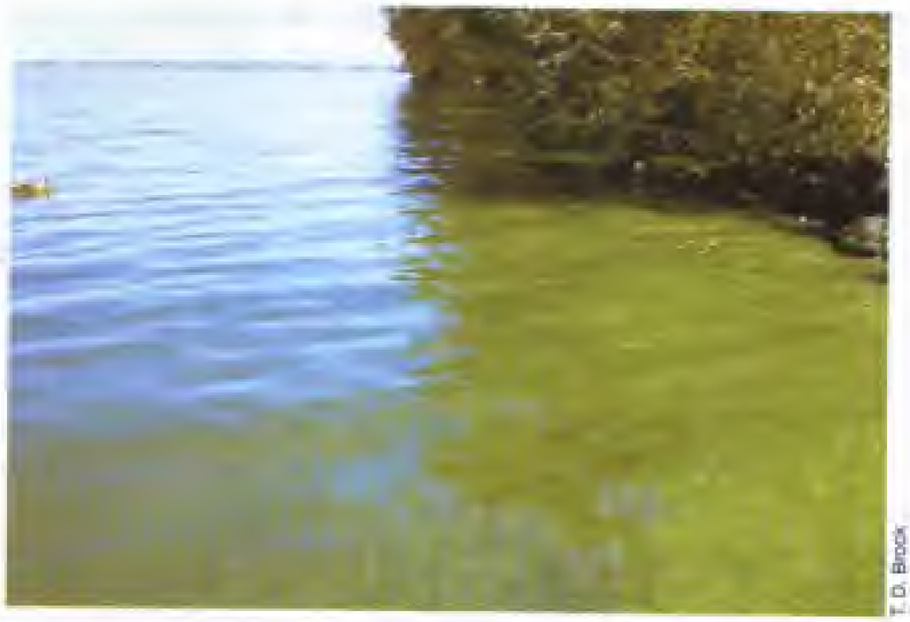

T. D. Brock

Figura 4.55 Flotación de cianobacterias con vesículas de gas en un lago rico en nutrientes. Lago Mendota, Madison, Wisconsin.

Estructura molecular de las vesículas de gas

Las vesículas de gas contienen sólo dos tipos de proteínas (Figura 4.58). La proteína principal se denomina GvpA y es una proteína pequeña, muy hidrofóbica y muy rígida. La rigidez es esencial para que la estructura de las vesículas de gas resista las presiones que se ejercen sobre ella

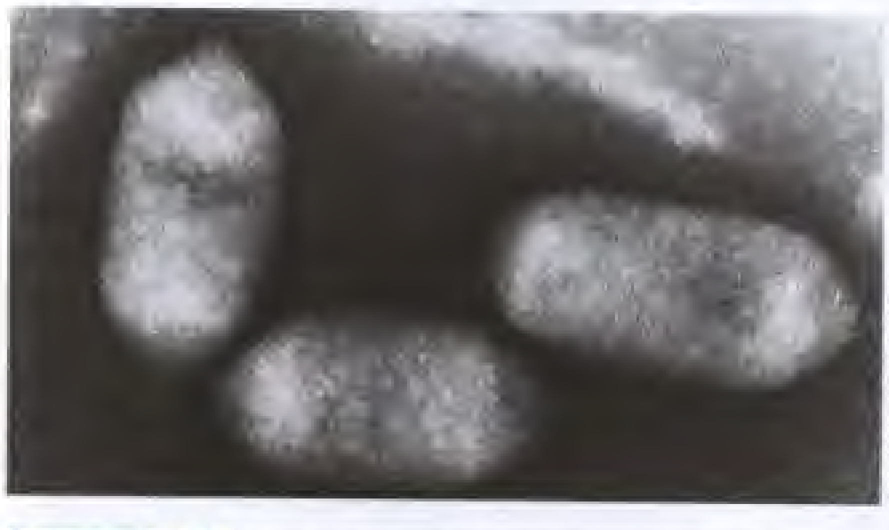
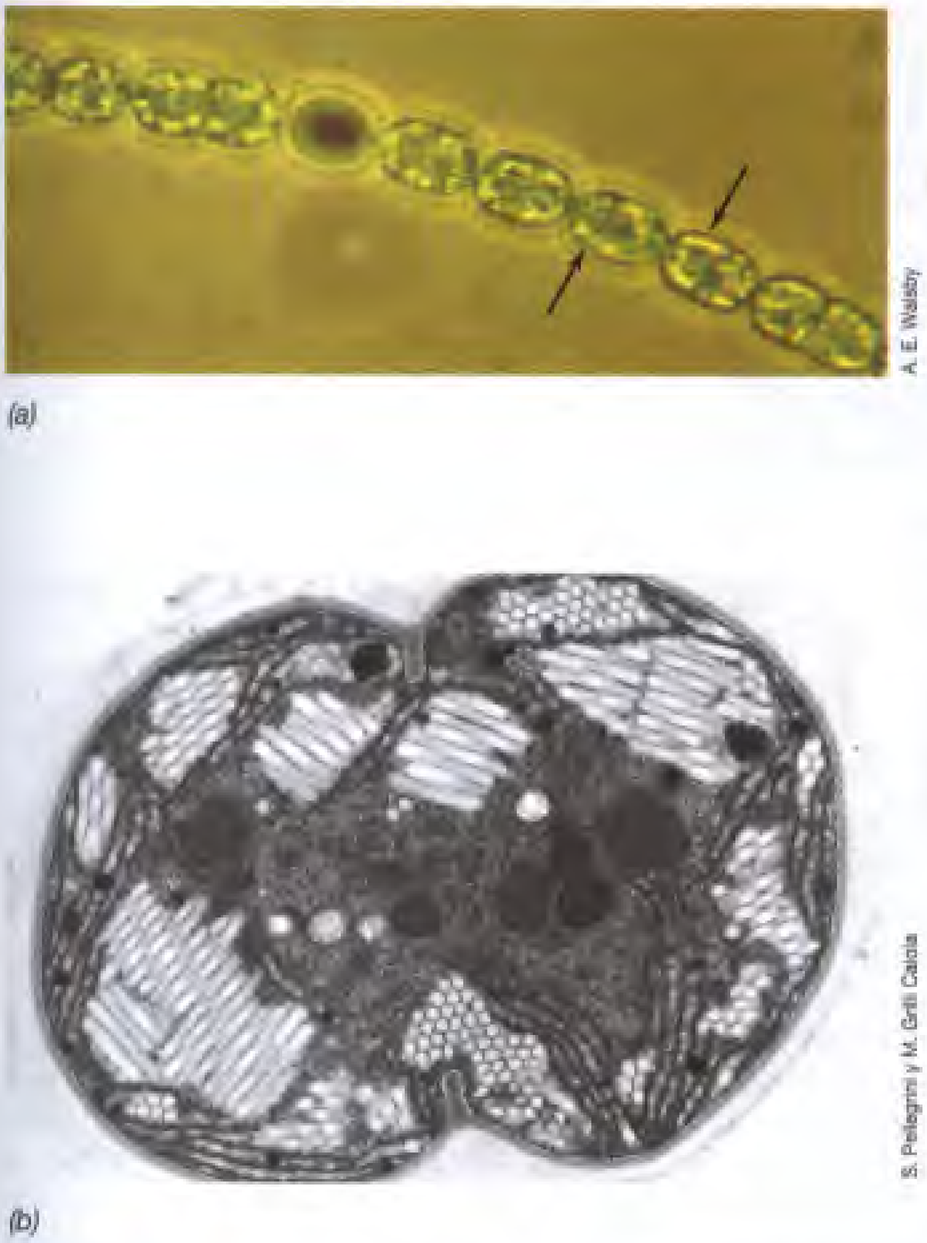

A. E. Konopka y J.T. Staley

Figura 4.56 Micrografía electrónica de transmisión de vesículas de gas purificadas de la bacteria *Ancyclobacter aquaticus* observadas mediante tinción negativa. Cada vesícula gaseosa tiene un diámetro aproximado de 100 nm. Reproducido con permiso de Allan E. Konopka, J. C. Lara y James Staley, 1977. *Archives of Microbiology* 112:133-140. ©1977 por Springer-Verlag GmbH & Co. KG.



A. E. Walsby

S. Pellegrini y M. Grilli Caiola

Figura 4.57 Vesículas de gas de las cianobacterias *Anabaena* y *Microcystis*. (a) *Anabaena flosaquae*. La célula del centro es un heterocisto que carece de vacuolas de gas. En las otras células, las vesículas se agrupan como objetos brillantes que dispersan la luz (flechas). (b) Micrografía electrónica de transmisión de la cianobacteria *Microcystis*. Las vesículas forman acúmulos que aquí aparecen seccionados transversal y longitudinalmente.

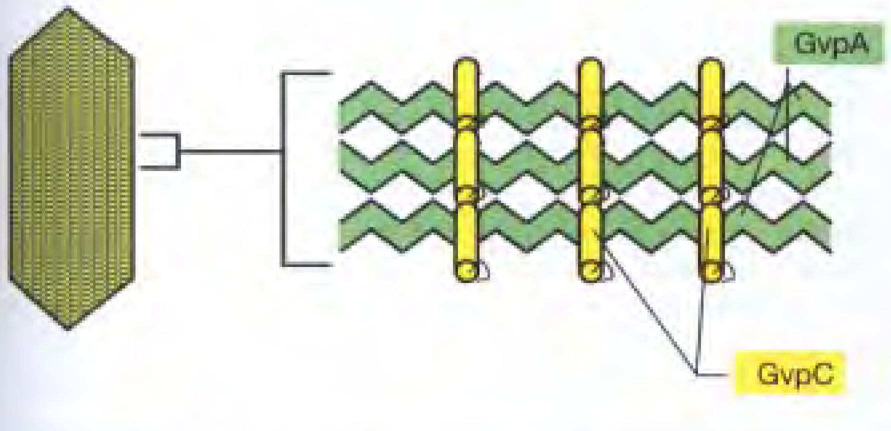


Figura 4.58 Modelo de interacción de las dos proteínas, GvpA y GvpC, que forman en las vesículas de gas una estructura impermeable al agua pero permeable al gas. GvpA forma los ejes y presenta una disposición rígida en hoja β. GvpC actúa como un agente de entrecruzamiento y presenta una disposición en hélice α (*véanse* Sección 3.7 y Figura 3.16).

desde fuera. GvpA es la proteína estructural y constituye hasta el 97% de la proteína total de la vesícula. Existe una segunda proteína denominada GvpC minoritaria y cuya función es reforzar la vesícula de gas (Figura 4.58).

Las vesículas de gas están formadas por varias copias de la proteína GvpA alineadas como capas paralelas, formando una superficie impermeable al agua. Las capas de GvpA se presentan reforzadas por GvpC, que entrelaza y mantiene unidas las cadenas de la proteína principal GvpA en una estrucutra reticulada (Figura 4.58). La forma final de la vesícula de gas depende de cómo se dispongan GvpA y GvpC para formar la vesícula intacta; y puede variar desde un aspecto largo y fino a una forma corta y achatada (compárense las Figuras 4.56 y 4.57*b*).

La membrana de las vesículas de gas es permeable a los gases, y la composición y presión del gas que se contiene en ellas es la misma que la del gas en el medio en el que se encuentra el organismo. Como las vesículas de gas presentan una densidad aproximada del 5-20% de la que posee el resto de la célula, dichas vesículas disminuyen la densidad celular y, por tanto, incrementan su flotabilidad. En el caso de los organismos acuáticos fototrofos esta estrategia es muy beneficiosa, ya que en una columna de agua les permite ajustar verticalmente su posición a regiones donde la intensidad de luz sea óptima para la fotosíntesis.

✓ 4.14 Revisión de conceptos

Las vesículas de gas son pequeñas estructuras llenas de gas y formadas por proteínas, cuya función es permitir la flotabilidad de las células. Estas vesículas contienen dos proteínas diferentes que se disponen formando una estructura reticular permeable a los gases pero impermeable al agua.

- ✓ ¿En qué benefician las vesículas de gas a las células fototrofas?
- ✓ ¿Cómo se disponen las dos proteínas que forman las vesículas de gas, GvpA y GVpC, para dar lugar a una membrana proteica impermeable al agua?

4.15 Endosporas

Algunas especies del dominio *Bacteria* producen en el interior de sus células estructuras especiales llamadas **endosporas** (Figura 4.59) durante un proceso denominado *esporulación* (*véase* Figura 4.63). Las endosporas son células diferenciadas extraordinariamente resistentes al calor y difíciles de destruir, incluso por agentes químicos muy agresivos. Las bacterias que forman endosporas se encuentran habitualmente en el suelo y puede decirse que cada muestra de suelo contiene alguna endospora. Entre las bacterias formadoras de endosporas, los géneros mejor conocidos son *Bacillus* y *Clostridium*.

El descubrimiento de las endosporas bacterianas tuvo una gran trascendencia para la microbiología, porque el conocimiento de la existencia de estas formas tan resistentes al calor fue decisivo para desarrollar procedimientos de esterilización; no sólo para medios de cultivo sino también para alimentos y otros productos perecederos. Aunque

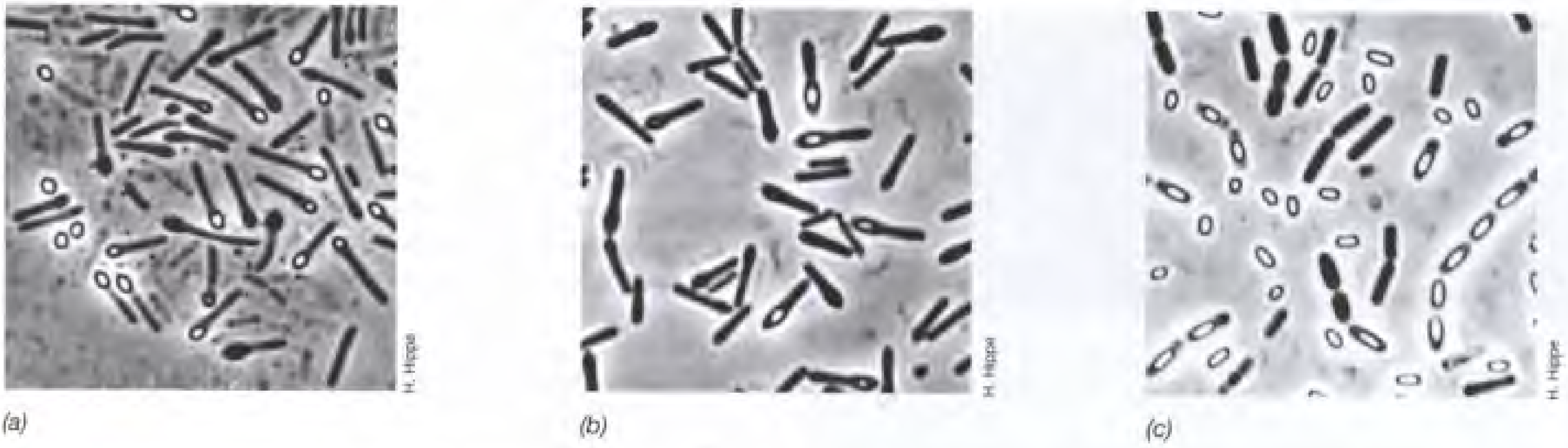


Figura 4.59 La endospora bacteriana. Micrografías de contraste de fases que ilustran varios tipos morfológicos de endosporas y su localización intracelular. (a) Terminal. (b) Subterminal. (c) Central.

otros organismos diferentes a las bacterias forman esporas, la endospora bacteriana es única en cuanto a su grado de termorresistencia. Las endosporas son también resistentes a otros agentes como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos, y pueden permanecer en estado de latencia durante periodos de tiempo muy largos (*véase* el recuadro «¿Cuánto tiempo puede sobrevivir una endospora?»).

Estructura de la endospora

Las endosporas (cuyo nombre alude al hecho de que se forman *dentro* de la célula) se observan fácilmente con el microscopio óptico como cuerpos muy refringentes (*véase* Figura 4.59). Las endosporas son muy impermeables a los colorantes, por lo que a veces se ven como regiones sin teñir dentro de las células que han sido teñidas con colorantes básicos como el azul de metileno. Para teñir las esporas se utilizan métodos específicos de tinción. La estructura de la espora tal como aparece al microscopio electrónico es muy diferente de la de la célula vegetativa. Como se aprecia en la Figura 4.60, es mucho más compleja y presenta muchas capas superficiales. La capa más externa es el **exosporio**, una fina y delicada cubierta de naturaleza proteica. Por debajo de ésta se encuentra la **cubierta de la espora**, que se compone de varias capas de proteínas específicas de la espora. Por debajo de la cubierta de la espora se localiza el **córtex**, que no es más que una capa de peptidoglicano con uniones laxas. Internamente, y por debajo del córtex, se presenta el **núcleo** o **protoplasto de la espora**, que contiene la pared celular normal (similar a la de la célula vegetativa), la membrana citoplasmática, el citoplasma, el nucleoide, etc. (*véanse* Sección 2.1 y Figura 2.1*a*). Por tanto, en esencia, la endospora se diferencia estructuralmente de la célula vegetativa en el tipo de estructuras situadas *fuera* de la pared del núcleo de la espora.

Un compuesto químico característico de las endosporas, ausente en las células vegetativas, es el **ácido dipicolínico** (Figura 4.61). Este compuesto se ha encontrado en todas las endosporas examinadas y se localiza en el núcleo de la espora. Las esporas son también muy ricas en iones calcio, que en gran parte se combinan con el ácido dipicolínico. Los complejos formados de dipicolinato cálcico suponen aproximadamente el 10% del peso seco de la endospora.

Propiedades de la endospora

El núcleo de una endospora madura difiere mucho de la célula vegetativa de la cual deriva. Además del abundante contenido en dipicolinato cálcico (Figura 4.61), el núcleo de esta estructura se presenta en un estado parcialmente deshidratado y contiene sólo el 10-30% del agua de la célula vegetativa, por lo que la consistencia del citoplasma se corresponde con la de un gel denso. La deshidratación aumenta mucho la termorresistencia de la endospora y al mismo tiempo le confiere resistencia frente a sustancias químicas, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y hace que las enzimas estén inactivadas.

Además del bajo contenido en agua, el pH del citoplasma de la endospora es aproximadamente una unidad menor que el de la célula vegetativa, y contiene niveles elevados de proteínas específicas denominadas *pequeñas proteínas ácido-solubles de la espora* (SASPs). Estas proteínas se forman durante el proceso de esporulación y tienen al menos dos funciones. Por un lado, se unen fuertemente al DNA y lo protegen de la lesión potencial de las radiaciones ultravioletas, la desecación y el calor seco. Por otro lado, las SASPs pueden servir como fuente de carbono y energía para el desarrollo de una nueva célula vegetativa a partir de la endospora, proceso que se denomina *germinación* (y que expondremos más adelante en esta sección).

Formación de la endospora

Durante la formación de la endospora, una célula vegetativa se convierte en una estructura inerte y termorresistente (Figura 4.62). Como se ha descrito previamente y se resume en la Tabla 4.2, las diferencias entre la endospora y la célula vegetativa son realmente importantes. La esporulación supone una compleja serie de procesos de *diferencia-*

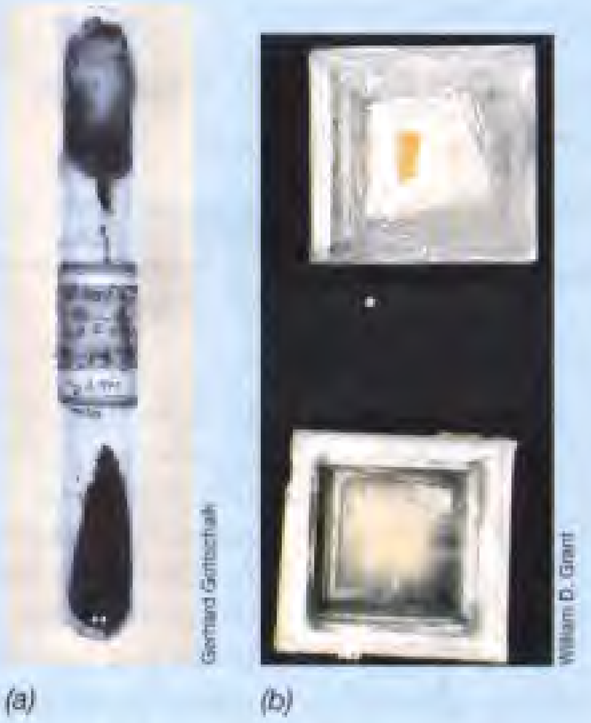
Atención a... ¿Cuánto tiempo puede sobrevivir una endospora?

En este capítulo hemos considerado la latencia y la resistencia de las endosporas bacterianas y se ha señalado que pueden sobrevivir durante mucho tiempo en estado latente. ¿Pero cuánto tiempo exactamente?

Los datos publicados sobre la longevidad de las endosporas indican que pueden permanecer viables (es decir, capaces de germinar para dar células vegetativas) como mínimo durante varias décadas y probablemente durante mucho más tiempo. En 1981 se colocó en un medio de cultivo una suspensión de esporas de *Clostridium aceticum* (Figura 1*a*) preparada en 1947 y, 34 años después, comenzó a crecer en menos de 12 horas dando lugar a un cultivo. *Clostridium aceticum* fue aislado originalmente en 1940 por el holandés K. T. Wieringa y se creyó que el vial con las esporas se había perdido, hasta que fue encontrado en un almacén de la Universidad de California en Berkely y posteriormente reactivado[1].

Existen otros ejemplos documentados sobre la longevidad de las endosporas. Las bacterias termófilas del género *Thermoactinomyces* son formadoras de endosporas y tienen una amplia distribución en el suelo, humus, y materia vegetal en fermentación. El análisis microbiológico de los restos arqueológicos romanos hallados en el Reino Unido, y datados hace unos 2000 años, permitieron descubrir un gran número de esporas viables de *Thermoactinomyces* en distintas muestras de residuos. Además, se recuperaron esporas de *Thermoactinomyces* en fracciones de estratos de sedimentos en un lago de Minessota con una antigüedad de unos 7.000 años. Aunque siempre es posible una contaminación, en estos estudios se procesaron las muestras de tal modo que se descartó cualquier contaminación por esporas actuales[2].

¿Qué factores podrían limitar la edad de una endospora? Uno de los factores más importantes que se ha tenido en cuenta es la radiación cósmica, que puede producir mutaciones en el DNA[2]. La hipótesis que se baraja es que, durante miles de años, los efectos acumulativos de las radiaciones cósmicas podrían producir multitud de mutaciones en el genoma de un organismo capaces de afectar incluso a estructuras tan resistentes como las endosporas; éstas terminarían por morir debido a las lesiones genéticas producidas. Sin embargo, las extrapolaciones efectuadas a partir de auténticas valoraciones experimentales sobre los efectos de la radiación natural en las endosporas sugieren que si éstas se protegen parcialmente, por ejemplo, embebidas en estratos de materia orgánica, las esporas pueden seguir siendo viables durante periodos de hasta *varios cientos de miles de años* y quizá aun más. Asombroso, pero, ¿es éste el límite máximo?


(a) Gerhard Gottschalk

(b) William D. Grant

Figura 1 Longevidad de las endosporas. (a) Fotografía de un tubo conteniendo esporas de la bacteria *Clostridium aceticum*, preparada el 7 de mayo de 1947. Tras permanecer en estado latente por más de 30 años, las esporas se sembraron en un medio de cultivo y el crecimiento ocurrió en 12 horas[1]. (b) Bacterias halófilas atrapadas en el interior de cristales de sal. Estos cristales se obtuvieron artificialmente en el laboratorio estando presentes células de *Halobacterium* (color naranja), que permanecieron viables en el interior. Se ha descrito que cristales similares a éstos, pero procedentes del periodo Pérmico (hace unos 250 millones de años), contenían endosporas bacterianas viables[4].

En 1955 un grupo de científicos publicó la resurrección de endosporas bacterianas cuya edad se estimaba en 25-40 millones de años[3]. Supuestamente, estas esporas fueron preservadas en los intestinos de una abeja extinguida atrapada en el ámbar de una era geológica conocida. La presencia de bacterias formadoras de endosporas en estas abejas se había sospechado ya en estudios de microscopía electrónica del intestino de insectos, que tenían estructuras parecidas a las endosporas y en los que se había recuperado DNA parecido al de *Bacillus*. Las muestras de tejido de abeja se incubaron en un medio de cultivo estéril que rápidamente permitió el desarrollo de bacterias formadoras de endosporas. Se tomaron rigurosas precauciones para demostrar que la bacteria capaz de formar endosporas, revivida a partir de la abeja incrustada en el ámbar, no era debida a una contaminación. Un hecho incluso más sorprendente fue el aislamiento de bacterias halófilas formadoras de endosporas a partir de inclusiones en cristales salinos procedentes del periodo Pérmico, es decir, de hace más de 250 millones de años[4]. Se supone que estas bacterias quedaron atrapadas dentro del cristal de salmuera cuando se formó (Figura 1*b*) y que han permanecido viables durante tantos años.

Si estas afirmaciones sobre la increíble longevidad de las endosporas se confirman mediante la repetición de los mismos resultados en laboratorios independientes (y dicha confirmación es decisiva para aceptar un hallazgo tan controvertido), significaría que las endosporas almacenadas en condiciones adecuadas pueden permanecer viables indefinidamente. Esto es un testimonio muy notable de que la endospora, una estructura que sin duda apareció evolutivamente para ayudar a las células a mantener su viabilidad durante periodos de tiempo relativamente cortos, ha sido tan bien diseñada que incluso puede permanecer latente y en estado viable por cientos de miles o millones de años. ■

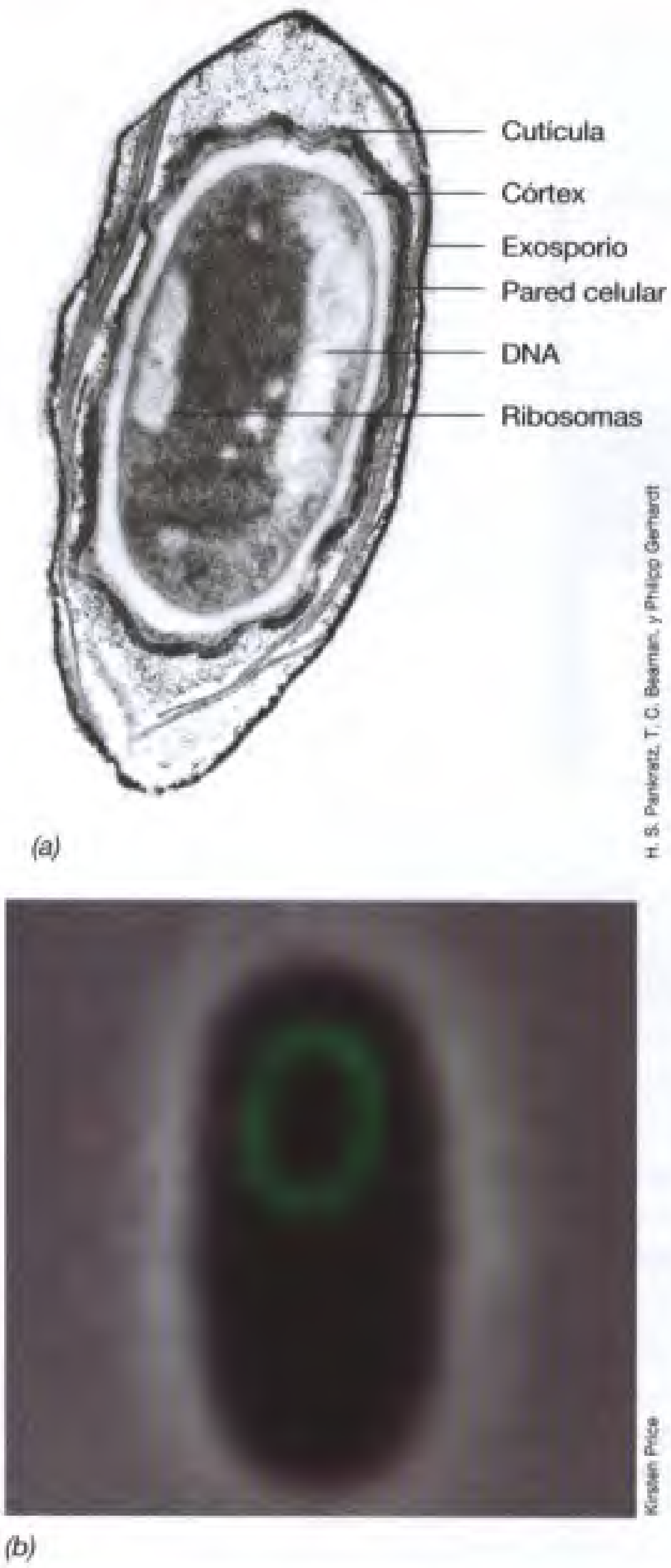
---

[1] Braun, M., F. Mayer y G. Gottschalk, 1981. *Clostridium aceticum* (Wieringa), a microorganisms producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Arch. Microbiol. 128*: 288-293.

[2] Gest, H. y J. Mandelstam, 1987. Longevity of microorganisms in natural environments. *Microbiol. Sci. 4*: 69-71.

[3] Cano, R.J. y M.K. Borucki, 1995. Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science 268*: 1060-1064.

[4] Vreeland, R.H., W.D. Rosenzweig y D.W. Powers, 2000. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature 407*: 897-900.



H. S. Pankratz, T. C. Beaman, y Philipp Gerhardt

Kirsten Price

Figura 4.60 La endospora bacteriana. (a) Micrografía electrónica de transmisión de una endospora madura de *Bacillus megaterium*. (b) Micrografía de fluorescencia de una célula de *Bacillus subtilis* en el proceso de esporulación. La zona verde se debe a un colorante que tiñe específicamente una proteína en la cutícula de la endospora.

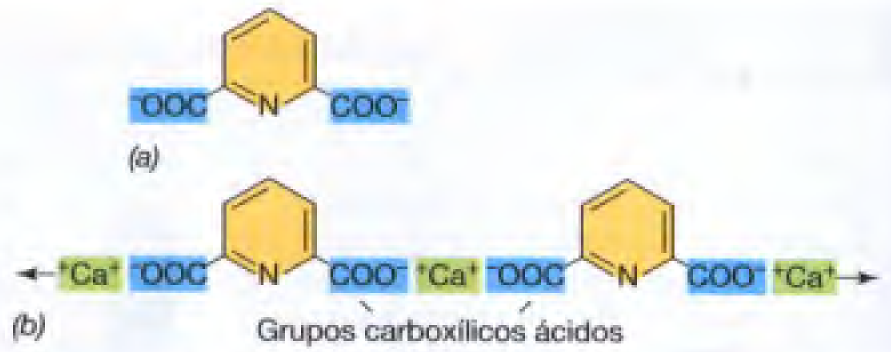


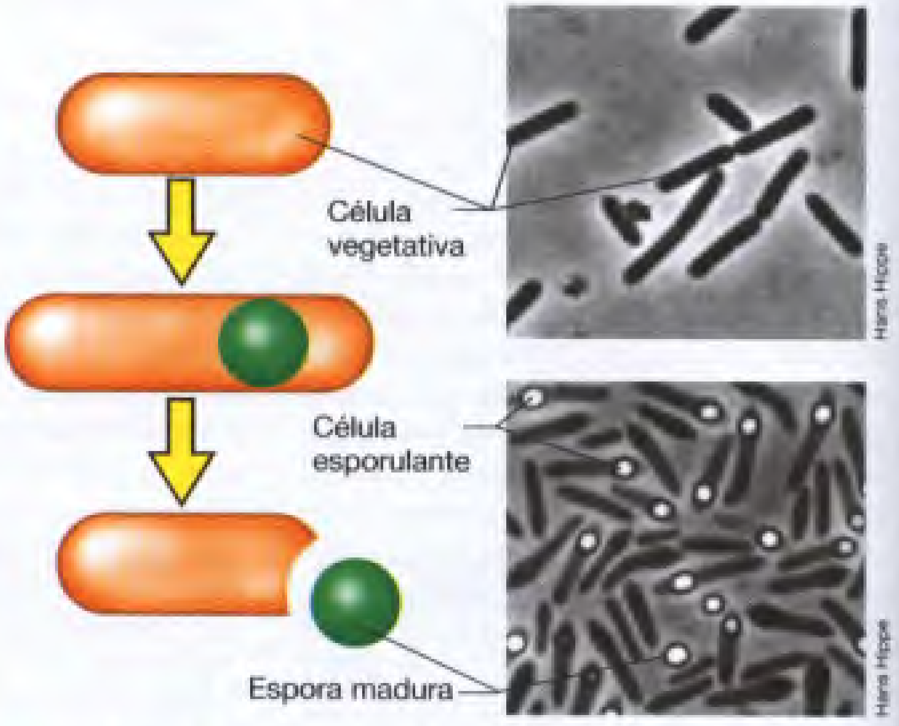
Figura 4.61 Ácido dipicolínico (DPA). (a) Estructura del DPA. (b) Entrecruzamiento de Ca^{2+} con las moléculas de DPA para formar un complejo.

ción celular. La esporulación bacteriana no se produce durante el crecimiento exponencial, sino únicamente al cesar el crecimiento como consecuencia de la limitación de un nutriente esencial. Por esta razón, una bacteria típica formadora de endosporas, como por ejemplo *Bacillus*, deja de crecer vegetativamente e inicia la esporulación tan pronto como se agota alguno de los nutrientes críticos, como la fuente de carbono o la fuente de nitrógeno.

La conversión de una célula vegetativa en endospora se basa en muchos cambios en la expresión de los genes de la célula. Los cambios estructurales que se producen durante la esporulación en *Bacillus* se muestran en la Figura 4.63 y el proceso puede dividirse en varias fases. En *Bacillus subtilis* el proceso completo de esporulación dura 8 horas y se ha estudiado con detalle. Mediante estudios genéticos con mutantes de *Bacillus*, cada uno de los cuales presenta un bloqueo en una de las fases de la esporulación, se ha demostrado que hay alrededor de 200 genes implicados en el proceso. La esporulación requiere el cese de la síntesis de algunas proteínas funcionales en la célula vegetativa y la síntesis de nuevas proteínas específicas (*véase* Figura 4.60*b*). Esto se lleva a cabo mediante la activación de diversos genes como *spo*, *ssp* (que codifica las SASPs) y muchos otros, en respuesta a estímulos ambientales que inducen la esporulación. Las proteínas codificadas por estos genes catalizan los cambios que conducen a la formación de una endospora deshidratada y metabólicamente inerte, pero muy resistente, a partir de una célula vegetativa hidratada y metabólicamente activa (Tabla 4.2 y Figura 4.63).

Germinación

Una endospora es capaz de permanecer en estado de latencia durante muchos años (*véase* el recuadro «¿Cuánto tiempo puede sobrevivir una endospora?»), pero también se



Hans Hippe

Hans Hippe

Figura 4.62 Formación de la endospora. Micrografía de contraste de fases de células de *Clostridiun pascui*.

TABLA 4.2 Diferencias entre las células vegetativas y las endosporas

Características	Célula vegetativa	Endospora
Estructura	Célula Gram positiva típica; unas pocas Gram negativas	Córtex grueso Cutícula Exosporio
Apariencia microscópica	No refráctil	Refráctil
Contenido en calcio	Bajo	Elevado
Ácido dipicolínico	Ausente	Presente
Actividad enzimática	Elevada	Baja
Metabolismo (consumo de O_2)	Elevado	Bajo o ausente
Síntesis macromolecular	Presente	Ausente
mRNA	Presente	Bajo o ausente
Resistencia al calor	Baja	Elevada
Resistencia a la radiación	Baja	Elevada
Resistencia a compuestos químicos (por ejemplo, H_2O_2) y ácidos	Bajo	Elevado
Tinción por colorantes	Teñible	Sólo teñible mediante métodos especiales
Acción de la lisozima	Sensible	Resistente
Contenido en agua	Elevado, 80-90%	Bajo, 10-25% en el centro
Pequeñas proteínas solubles en ácido (producto de los genes *ssp*)	Ausentes	Presente
pH citoplásmico	Alrededor de pH 7	pH entre 5,5-6,0 (en el núcleo)

puede dar lugar a una célula vegetativa de un modo relativamente rápido. Este proceso ocurre en tres pasos: activación, germinación y crecimiento (Figura 4.64).

La *activación* se realiza fácilmente por el calentamiento de las endosporas recién formadas, durante varios minutos a una temperatura subletal pero elevada. Las endosporas activadas quedan así condicionadas a germinar cuando se colocan en presencia de los nutrientes adecuados. La *germinación* es normalmente un proceso rápido que ocurre en cuestión de minutos y supone la pérdida de refringencia de la espora, un aumento en la capacidad de tinción por colorantes, y la pérdida de la resistencia al calor y a sus-

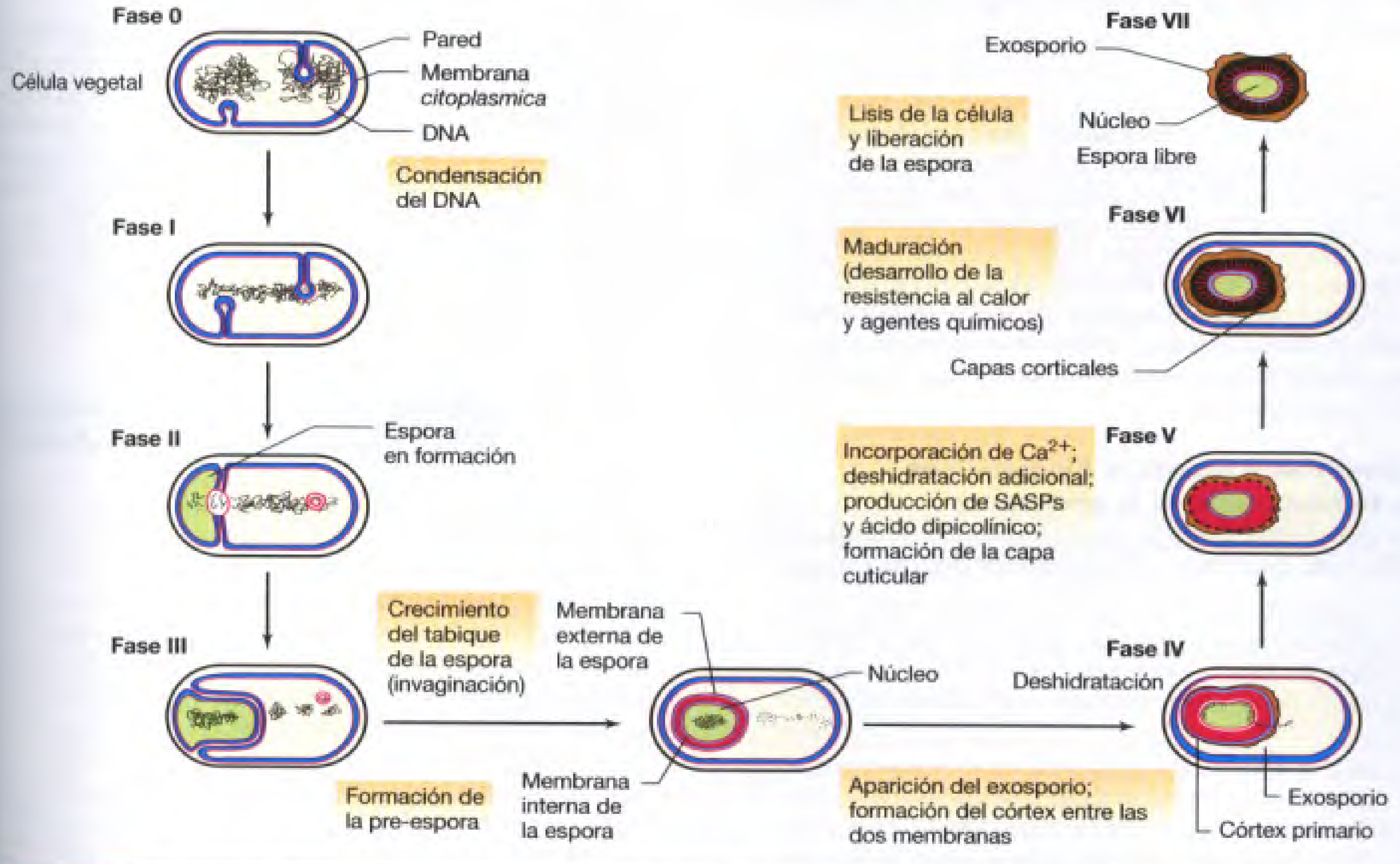

Fase 0
Célula vegetal
Pared
Membrana
citoplasmica
DNA
Condensación del DNA
Fase I
Fase II
Espora en formación
Fase III
Crecimiento del tabique de la espora (invaginación)
Formación de la pre-espora
Membrana externa de la espora
Membrana interna de la espora
Núcleo
Aparición del exosporio; formación del córtex entre las dos membranas
Fase IV
Deshidratación
Exosporio
Córtex primario
Fase V
Incorporación de Ca2+; deshidratación adicional; producción de SASPs y ácido dipicolínico; formación de la capa cuticular
Fase VI
Maduración (desarrollo de la resistencia al calor y agentes químicos)
Capas corticales
Fase VII
Exosporio
Núcleo
Espora libre
Lisis de la célula y liberación de la espora

Figura 4.63 Fases en la formación de una espora. Las fases señaladas (enumeradas del 0 a VII) han sido definidas tanto a partir de estudios genéticos como de análisis microscópicos.

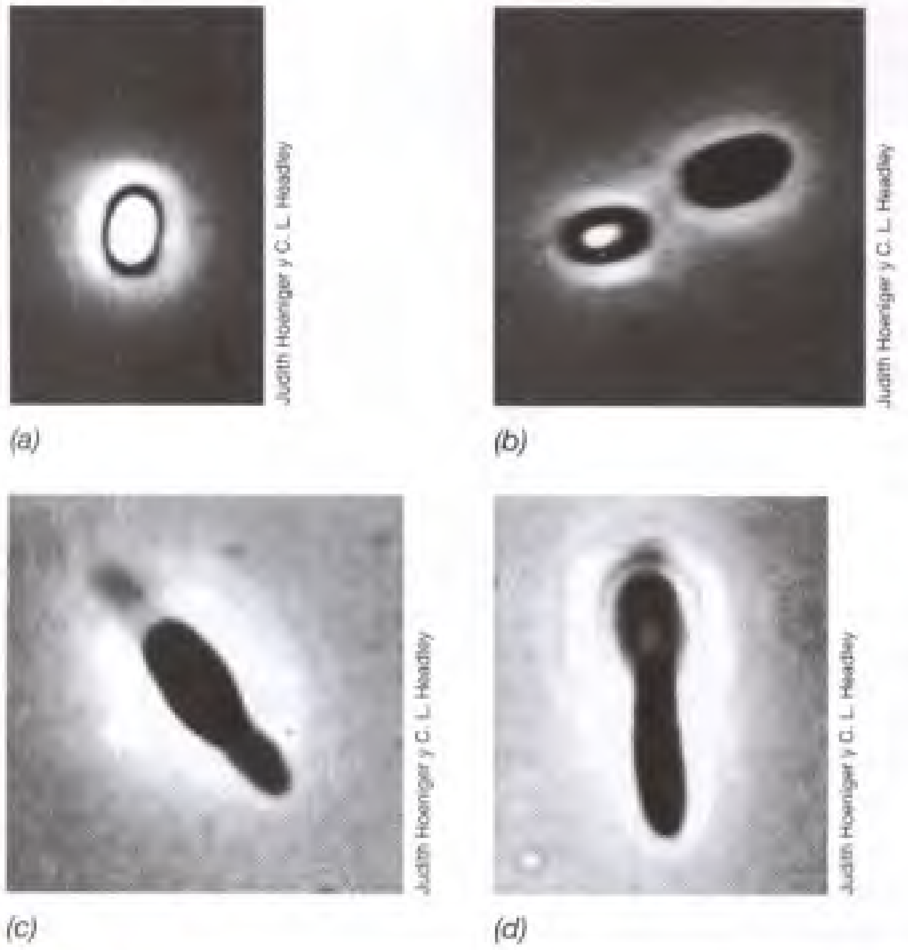

(a)
(b)
(c)
(d)
Judith Hoeniger y C. L. Headley
Judith Hoeniger y C. L. Headley
Judith Hoeniger y C. L. Headley
Judith Hoeniger y C. L. Headley

Figura 4.64 Germinación de la endospora en *Bacillus:* conversión de la endospora madura (a) a una célula vegetativa (d); las micrografías muestran la secuencia de procesos que se inician con la espora refringente. En la activación (b) se pierde la refractibilidad, mientras que en (c) y (d) se aprecia la emergencia de la nueva célula vegetativa (crecimiento).

tancias químicas. En esta fase se produce la desaparición del dipicolinato cálcico y de los componentes del córtex, y se degradan las SASPs. La siguiente fase, el *crecimiento*, se caracteriza por un hinchamiento visible de la célula debido a una acumulación de agua y por síntesis *de novo* de RNA, proteínas y DNA. Finalmente, la célula emerge una vez rota la cubierta de la endospora y se divide (Figura 4.64). La célula continúa luego en crecimiento vegetativo hasta que nuevamente detecta señales ambientales que ponen en marcha la esporulación.

Diversidad y aspectos filogenéticos de la formación de la endospora

¿Es muy habitual el proceso de formación de endosporas? Se ha visto que cerca de 20 géneros de *Bacteria* son capaces de esporular (*véase* Tabla 12.25), aunque el proceso solo se ha estudiado con detalle en unas pocas especies de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*. No obstante, muchas de las claves para la supervivencia de la endospora, como la formación de complejos de dipicolinato cálcico (Figura 4.61) y la presencia de genes específicos de esporulación, parecen ser universales. Probablemente, los principios generales que rigen la formación de la endospora son los mismos en todos los organismos capaces de esporular.

Desde una perspectiva filogenética, la capacidad para producir endosporas está específicamente asociada a un sublineaje particular de bacterias Gram positivas (*véanse* Secciones 2.5 y 12.21). No obstante, las fisiologías de las bacterias formadoras de esporas son muy diversas e incluyen anaerobios, aerobios, fototrofos y quimiolitotrofos. Considerando esta diversidad fisiológica, las señales que inducen la formación de endosporas pueden variar en diferentes especies y pueden incluir otras señales además del ayuno de nutrientes, la señal principal para la formación de endosporas en las especies de *Bacillus* y *Clostridium*. No se ha visto que ninguna de las especies de *Archaea* sea capaz de esporular, y si esto fuera así, indicaría que la capacidad para producir endosporas evolucionó *después* de que las principales líneas evolutivas procarióticas divergieran hace miles de millones de años (*véanse* Sección 2.3 y Figura 2.7).

✓ 4.15 Revisión de conceptos

La endospora es una célula bacteriana muy diferenciada y resistente producida por algunos tipos de *Bacteria* Gram positivas. La formación de la espora da lugar a una forma celular casi totalmente deshidratada, que contiene las macromoléculas esenciales y varias sustancias que no se encuentran en las células vegetativas, como el dipicolinato cálcico y pequeñas proteínas específicas solubles en medio ácido. Las esporas pueden permanecer en estado de latencia indefinidamente, pero germinan con rapidez cuando se produce el estímulo adecuado.

- ✓ ¿Qué es y dónde se encuentra el ácido dipicolínico?
- ✓ ¿Qué son las SASPs y cuál es su función?
- ✓ ¿Qué sucede cuando germina una endospora?

Preguntas de repaso

1. ¿Cuál es la finalidad de la tinción de las muestras en la microscopía óptica? ¿Por qué se utilizan los colorantes catiónicos como agentes generales de tinción?
2. ¿Qué ventaja ofrece el microscopio de *contraste de interferencia diferencial* respecto al microscopio de campo claro? Y, ¿qué ventaja presenta el microscopio de *contraste de fases* sobre el de campo claro?
3. ¿Cuál es la principal ventaja de los microscopios electrónicos sobre los microscopios ópticos? ¿Qué tipo de microscopio electrónico utilizaría para ver las estructuras tridimimensionales de una célula?
4. ¿Cuáles son las principales morfologías de los procariotas? Para cada morfología que cite dibuje algunas células.
5. Describa en una sola frase la manera en la que se construye una unidad de membrana a partir de moléculas de fosfolípidos.
6. Explique en una sola frase porqué las moléculas ionizadas no atraviesan con facilidad la barrera de la membrana celular. ¿Cómo pueden atravesar la membrana citoplasmática?
7. Describa una de las principales diferencias químicas entre membranas de *Bacteria* y *Archaea*.
8. Las células de *Escherichia coli* incorporan la lactosa por medio de la permesa Lac, la glucosa por la vía del sistema fosfotransferasa, y maltosa mediante un transportador de tipo ABC. Para cada uno de estos azúcares, describa: (1) los componentes de su sistema de transporte y (2) la fuente de energía que sustenta el proceso de transporte.
9. ¿Por qué se denomina *peptidoglicano* a la capa rígida de la pared celular bacteriana? ¿Cuáles son las razones químicas que explican la rigidez que confiere el peptidoglicano a la pared celular?
10. Teniendo en cuenta que una sola molécula de *peptidoglicano* es muy *fina*, explique en términos químicos cómo se forma la *gruesa* capa de peptidoglicano en la pared celular de *Bacteria* Gram positivas.
11. Enumere varias funciones de la membrana externa de la pared en *Bacteria* Gram negativas. ¿Cuál es la composición química de la membrana externa?
12. En dos o tres frases, dé una explicación lógica de por qué la sacarosa es capaz de estabilizar las células bacterianas sin que se lisen las células una vez tratadas con lisosoma.
13. Describa la estructura y función de un flagelo bacteriano. ¿Cuál es la fuente de energía para el flagelo?
14. ¿En qué se diferencian los mecanismos de movilidad por deslizamiento de *Flavobacterium* y la movilidad de *Escherichia coli*?
15. Explique en unas pocas frases el modo por el cual una bacteria móvil percibe la dirección en que se encuentra una sustancia atrayente y se mueve hacia ella.
16. ¿Qué tipos de inclusiones *citoplásmicas* forman los procariotas? ¿En qué difieren en cuanto a composición y papel metabólico una inclusión de poli-β-hidroxibutirato (PBH) y un magnetosoma?
17. ¿Cuál es la función de las vesículas de gas? ¿Cómo es la estructura que permite retener el gas en su interior?
18. Indique brevemente las diferencias entre una célula vegetativa y una endospora en cuanto a la estructura, composición química y capacidad para resistir condiciones ambientales extremas.
19. El descubrimiento de la endospora tuvo una gran importancia práctica. ¿Por qué?
20. Defina los siguientes términos: endospora madura, célula vegetativa y germinación.
21. ¿Cuánto tiempo permanecen viables las esporas en un «estado de latencia» y cuál es la prueba de ello?

Ejercicios prácticos

1. Calcule el tamaño del objeto más pequeño que puede resolverse si se utiliza una luz de 600 nm para observar la muestra con un objetivo de inmersión 100× y una apertura numérica de 1,32. ¿De qué forma podría mejorarse la resolución empleando esa misma lente?
2. Calcule la relación superficie/volumen de una célula esférica de 15 μm de diámetro y de una célula de 2 μm de diámetro. ¿Qué consecuencias tienen estas diferencias en dicha relación para la función celular?
3. Imagine un planeta donde la vida hubiese evolucionado en un ambiente sin agua. Las células de ese planeta tendrían un citoplasma muy hidrofóbico y vivirían en un ambiente anhídrido. Vaticine y dibuje la estructura del tipo de membrana que tendrían los organismos de tal planeta, y explique la razón de la idoneidad de dicha membrana para esos organismos.
4. Teniendo en cuenta la naturaleza de la pared celular y la membrana bacterianas, explique por qué un bacilo adopta una forma esférica cuando se elimina su pared celular en condiciones en que no ocurre la lisis osmótica.
5. Suponga que se le proporcionan dos cultivos, uno de una especie de *Bacteria* Gram negativa y otro de una especie de *Archaea*. Sin recurrir a la secuenciación del RNA ribosómico (*véase* Sección 2.3), exponga al menos cuatro formas de diferenciar cada cultivo.

Para estudiar los microorganismos en el laboratorio es necesario cultivarlos, es decir, crecerlos. Esto se puede realizar de muchos modos, incluyendo el uso de medios de cultivo sólidos en placas de Petri, como se ilustra aquí. Las células individuales que se extienden sobre la placa, crecen y se dividen hasta formar *colonias*. Aunque algunos principios nutricionales se aplican a todos los organismos, muchos microorganismos presentan necesidades nutritivas y de cultivo que son especiales. Además, para mantener los procesos vitales, todos los microorganismos llevan a cabo reacciones que les permiten obtener energía. Para comprender cómo viven las células microbianas en sus hábitat naturales es necesario comprender su nutrición y su bioenergética.

5

NUTRICIÓN, CULTIVO Y METABOLISMO MICROBIANO

I NUTRICIÓN Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS 103
5.1 Nutrición microbiana 103
5.2 Medios de cultivo 107
5.3 Cultivo de microorganismos en el laboratorio 108
II ENERGÍA Y ENZIMAS 110
5.4 Bioenergética 110
5.5 Catálisis y enzimas 111
III OXIDACIÓN-REDUCCIÓN Y COMPUESTOS DE ALTA ENERGÍA 113
5.6 Oxidación-reducción 114
5.7 El NAD como un transportador redox de electrones 116
5.8 Compuestos de alta energía y almacenamiento de energía 118
IV PRINCIPALES RUTAS CATABÓLICAS, TRANSPORTE DE ELECTRONES Y FUERZA MOTRIZ DE PROTONES 119
5.9 Conservación de la energía: opciones 119
5.10 La glucolisis como ejemplo de fermentación 120
5.11 Respiración y transportadores de electrones asociados a membranas 122
5.12 Conservación de la energía a partir de la fuerza motriz de protones 125
5.13 Flujo del carbono en la respiración: el ciclo del ácido cítrico 129
V DIVERSIDAD CATABÓLICA Y VISIÓN GLOBAL DE LA BIOSÍNTESIS 130
5.14 Alternativas catabólicas 130
5.15 Biosíntesis de monómeros 131

Glosario

Aceptor de electrones una sustancia que puede aceptar electrones de otra sustancia y que se reduce durante el proceso

Aerobio un microorganismo capaz de usar O_2 en la respiración

Anabolismo la suma total de todas las reacciones biosintéticas de la célula

Anaerobio un microorganismo que crece en ausencia de O_2

ATP sintetasa (ATPasa) complejo enzimático multiproteico anclado en la membrana que cataliza la síntesis de ATP acoplada a la fuerza motriz de protones

Autótrofo un organismo capaz de biosintetizar todo el material celular a partir del CO_2 como única fuente de carbono

Catabolismo conjunto de reacciones bioquímicas que conducen a la producción de energía utilizable por la célula (normalmente ATP)

Catalizador una sustancia que acelera una reacción química pero que no se consume en la reacción.

Ciclo del ácido cítrico un ciclo de reacciones que dan como resultado la conversión del acetato en dos moléculas de CO_2

Coenzima una pequeña molécula no proteica que participa en una reacción catalítica como parte de una enzima

Cultivo axénico o puro un cultivo microbiano que contiene una única clase de microorganismo

Donador de electrones una sustancia que puede ceder electrones a un aceptor y que se oxida durante el proceso

Endotérmica que requiere energía

Energía de activación es la energía requerida para llevar al sustrato a un estado reactivo

Energía libre energía disponible para la realización de un trabajo (se representa por G)

Enzima una proteína que tiene la capacidad de acelerar (catalizar) una reacción química específica

Exotérmica que libera energía

Fermentación catabolismo anaeróbico en el que un compuesto orgánico sirve al mismo tiempo como donador y como aceptor de electrones y en el que el ATP se produce por fosforilación a nivel de sustrato

Fosforilación a nivel de sustrato producción de ATP por transferencia directa de una molécula de fosfato de alta energía desde un compuesto orgánico fosforilado hasta ADP

Fosforilación oxidativa producción de ATP a expensas de la fuerza motriz de protones generada por el transporte de electrones

Fotofosforilación producción de ATP mediante la fuerza motriz de protones formada por reacciones fotosintéticas

Fuerza motriz de protones un estado energético de la membrana que deriva de la separación de la carga y los elementos del agua (H^+ frente a OH^-) a través de la membrana

Glicolisis una ruta bioquímica mediante la cual se fermenta la glucosa para producir energía (ATP) y varios productos resultantes de la fermentación. También se denomina ruta de Embden-Meyerhof

Medio complejo un medio de cultivo compuesto por hidrolizados de sustancias químicas no definidas, como extractos de levadura o de carne

Medio de cultivo una solución acuosa de varios nutrientes que permite el crecimiento de los microorganismos

Medio definido un medio de cultivo del que se conoce su composición química exacta

Potencial de reducción la tendencia intrínseca (medida en voltios) de una sustancia para donar electrones

Respiración proceso en el que un compuesto es oxidado con O_2 (o un sustituto del O_2), que funciona como aceptor terminal de electrones, y que normalmente se acompaña de la producción de ATP por fosforilación oxidativa

Sideróforos agentes quelantes de hierro que pueden unir hierro presente en muy bajas concentraciones

Técnica aséptica conjunto de manipulaciones utilizadas para evitar contaminaciones durante el manejo de objetos estériles o de cultivos microbianos

---

I NUTRICIÓN Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS

Una característica importante de las células es su capacidad para llevar a cabo reacciones químicas y organizar sus moléculas para formar estructuras específicas. La expresión final de esta organización es el crecimiento (replicación). Antes de que una célula se divida, deben ocurrir muchas reacciones químicas en la célula; estas reacciones se denominan **metabolismo.** Las reacciones metabólicas o bien *liberan energía*, llamadas **reacciones catabólicas**, o bien *consumen energía*, llamadas **reacciones anabólicas**. En las células ocurren varios tipos de reacciones catabólicas y anabólicas; en este capítulo y siguientes examinaremos algunas de las más importantes.

Antes de considerar algunas reacciones clave del metabolismo, explicaremos cómo se cultivan los microorganismos en el laboratorio. Por supuesto, la mayor parte de lo que se sabe acerca de las actividades metabólicas de los microorganismos procede del estudio de cultivos en el laboratorio. Nos centraremos aquí en el estudio de los *quimioorganotrofos*, es decir, de aquellos microorganismos que utilizan compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía. Posteriormente, consideraremos otros mecanismos de obtención de energía distintos de la quimioorganotrofía. Los organismos que emplean estas alternativas metabólicas también se cultivan en el laboratorio, y muchos de los principios básicos de la nutrición y de cultivo que ahora se comentan también son aplicables a ellos.

5.1. Nutrición microbiana

Recordemos lo dicho en el Capítulo 3 acerca de que las células están compuestas fundamentalmente de macromoléculas y de agua, y que las macromoléculas se componen de unidades más pequeñas denominadas monómeros (*véase* Sección 3.2). En esencia, la nutrición microbiana consiste en suministrar a las células los ingredientes químicos que necesitan para hacer monómeros. Estos compuestos químicos son los **nutrientes**. Diferentes organismos necesitan diferentes tipos de nutrientes y a menudo los requeri-

TABLA 5.1 Macronutrientes en la naturaleza y en los medios de cultivo

Elemento	Forma normal del nutriente en el ambiente	Forma suministrada en el medio de cultivo
Carbono (C)	CO_2, compuestos orgánicos	Glucosa, malato, acetato, piruvato, aminoácidos, cientos de otros compuestos o mezclas complejas (extracto de levadura, peptona, etc.)
Hidrógeno (H)	H_2O, compuestos orgánicos	H_2O, compuestos orgánicos
Oxígeno (O)	H_2O, O_2, compuestos orgánicos	H_2O, O_2, compuestos orgánicos
Nitrógeno (N)	NH_3, NO_3^-, N_2, compuestos orgánicos nitrogenados	*Inorgánico:* NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$, KNO_3, N_2 *Orgánico:* aminoácidos, bases nitrogenadas de nucleótidos, muchos otros compuestos orgánicos con N
Fósforo (P)	PO_4^{3-}	KH_2PO_4, Na_2HPO_4
Azufre (S)	H_2S, SO_4^{2-}, compuestos orgánicos con S, sulfuros metálicos (FeS, CuS, ZnS, NiS, etc.)	Na_2SO_4, $Na_2S_2O_3$, Na_2S, cisteína u otros compuestos orgánicos azufrados
Potasio (K)	K^+ en solución o como varias sales con K	KCl, KH_2PO_4
Magnesio (Mg)	Mg^{2+} en solución o como varias sales con Mg	$MgCl_2$, $MgSO_4$
Sodio (Na)	Na^+ en solución, NaCl o como otras sales con Na	NaCl
Calcio (Ca)	Ca^{2+} en solución, CaSO4 o como otras sales con Ca	$CaCl_2$
Hierro (Fe)	Fe^{2+} o Fe^{3+} en solución, FeS, $Fe(OH)_3$ o como otras sales con Fe	$FeCl_3$, $FeSO_4$, varias soluciones de hierro quelado (Fe3+ EDTA, Fe3+ citrato, etc.)

mientos son específicos. Además, no todos los nutrientes se requieren en las mismas cantidades; algunos, llamados *macronutrientes* (Tabla 5.1), se precisan en grandes cantidades; mientras que otros, llamados *micronutrientes*, se requieren en menores cantidades, y a veces sólo en cantidades trazas. Comenzaremos considerando los macronutrientes más importantes, el *carbono* y el *nitrógeno*.

Carbono y nitrógeno

Muchos procariotas necesitan algún tipo de compuesto orgánico como fuente de **carbono**. Los estudios nutricionales han demostrado que las bacterias pueden asimilar varios compuestos orgánicos carbonados y usarlos para hacer nuevo material celular. Los aminoácidos, los ácidos grasos, los ácidos orgánicos, los azúcares, las bases nitrogenadas, los compuestos aromáticos y un sinfín de compuestos orgánicos de otro tipo pueden ser usados por una u otra bacteria. Algunos procariotas son autótrofos, capaces de construir todas sus estructuras orgánicas a partir del dióxido de carbono (CO_2) con la energía obtenida de la luz o de compuestos inorgánicos. En peso seco, una célula típica contiene un 50% de carbono; el carbono es el principal elemento de todas las clases de macromoléculas.

Después del carbono, el siguiente elemento más abundante en la célula es el **nitrógeno**. En una bacteria típica alrededor del 12% de su peso seco es nitrógeno, este elemento es importante en las proteínas, en los ácidos nucleicos y en otros constituyentes celulares. En la naturaleza, el nitrógeno se presenta en forma inorgánica y orgánica (Tabla 5.1). Sin embargo, la mayor parte del nitrógeno natural disponible está en forma inorgánica, como amoniaco (NH_3), nitratos (NO_3^-) o N_2. La mayoría de las bacterias son capaces de usar amoniaco como única fuente de nitrógeno, y otras muchas pueden usar nitratos. El nitrógeno gaseoso (N_2) puede ser usado como fuente de nitrógeno por algunas bacterias, las *bacterias fijadoras de nitrógeno*, y estudiaremos más adelante las propiedades de estos organismos con detalle (*véanse* Secciones 12.9, 17.28 y 19.12).

Otros macronutrientes: P, S, K, Mg, Ca, Na

El **fósforo** se presenta en la naturaleza en forma de fosfatos orgánicos e inorgánicos, y la célula lo necesita fundamentalmente para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos. El **azufre** se requiere porque es un componente estructural de los aminoácidos cisteína y metionina (*véase* Sección 3.6) y porque se presenta en ciertas vitaminas, como la tiamina, la biotina, y el ácido lipoico, así como en el coenzima A. El azufre sufre una serie de transformaciones químicas en la naturaleza, muchas de las cuales son llevadas a cabo exclusivamente por microorganismos (*véase* Sección 19.13) y es utilizado por ellos en varias formas químicas. La mayoría del azufre celular procede de fuentes inorgánicas, ya sean sulfatos (SO_4^{2-}) o sulfuros (HS^-) (Tabla 5.1).

El **potasio** es necesario en todos los organismos. Una gran diversidad de enzimas lo requieren específicamente, como por ejemplo algunas implicadas en la síntesis de proteínas. El **magnesio** funciona como estabilizador de los ribosomas, las membranas celulares y los ácidos nucleicos, y también se necesita para la actividad de muchas enzimas. El **calcio** (que no es un nutriente esencial para el crecimiento de muchos microorganismos) ayuda a estabilizar la pared celular bacteriana y tiene una función importante en la termorresistencia de las endosporas (*véase* Sección 4.15). El **sodio** es requerido por algunos microorganismos, aunque no todos, y su necesidad suele ser un reflejo del hábitat del microorganismo. Por ejemplo, el agua de mar tiene un elevado contenido de sodio y los microorganismos marinos normalmente lo requieren para su crecimiento; en cambio, otras especies muy relacionadas, pero de agua dulce, crecen bien en ausencia de este elemento.

Hierro

El **hierro** es fundamental en la respiración celular y es también un elemento clave para los citocromos y para las proteínas que contienen hierro y azufre implicadas en el transporte de electrones (*véanse* Sección 5.11 y Tabla

TABLA 5.2 Micronutrientes (elementos traza) necesarios para organismos vivos[a]

Elemento	Función celular
Cromo (Cr)	Requerido por los mamíferos para el metabolismo de la glucosa; se desconoce si los microorganismos lo requieren
Cobalto (Co)	Vitamina B_{12}; transcarboxilasa (bacterias del ácido propiónico)
Cobre (Cu)	En la respiración, citocromo c oxidasa; en fotosíntesis, plastocianina y en algunas superóxido dismutasas
Manganeso (Mn)	Activador de muchas enzimas; presente en algunas superóxido dismutasas y en la enzima que rompe el agua en fototrofos oxigénicos
Molibdeno (Mo)	Algunas enzimas que contienen flavinas; nitrogenasa, nitrato reductasa, sulfito oxidasa, DMSO-TMAO reductasas y algunas formato deshidrogenasas
Niquel (Ni)	La mayoria de las hidrogenasas; coenzima F_{430} de metanógenos, deshidrogenasa del monóxido de carbono y ureasa
Selenio (Se)	Formato deshidrogenasa; algunas hidrogenasas y el aminoácido selenocisteína
Tungsteno (W)	Algunas formato deshidrogenasas y oxotransferasas de los hipertermófilos
Vanadio (V)	Vanadio nitrogenasa; bromoperoxidasa
Zinc (Zn)	Anhidrasa carbónica, alcohol deshidrogenasa, RNA y DNA polimerasas, y muchas proteinas que se unen al DNA
Hierro (Fe)[b]	Citocromos, catalasas, peroxidasas, proteínas con hierro y azufre, oxigenasas y todas las nitrogenasas

[a] No todos los micronutrientes indicados son requeridos por todas las células; algunos se necesitan sólo en microorganismos muy específicos.

[b] Necesario en mayores cantidades que otros metales. Normalmente no se considera elemento traza.

5.2). En condiciones anaeróbicas, el hierro se encuentra por lo general en el estado de oxidación +2 y es soluble. Sin embargo, bajo condiciones aeróbicas suele estar en el estado de oxidación +3 y forma varios minerales insolubles. Para obtener hierro de tales minerales, las células producen agentes quelantes de hierro llamados **sideróforos** que solubilizan el hierro y lo transportan dentro de la célula. Un grupo importante de sideróforos derivan del ácido hidroxámico y quelan el hierro férrico (Fe^{+3}) fuertemente (Figura 5.1*a*). Una vez que el complejo hierro-hidroxamato pasa a la célula, el hierro se libera y el hidroxamato puede salir y ser reutilizado de nuevo para el transporte del hierro. Las bacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* producen sideróforos fenólicos, estructuralmente complejos, llamados **enterobactinas** (Figura 5.1*b*). Estos sideróforos derivan del compuesto aromático catecol y tienen una elevada afinidad de unión de hierro. Sin tales agentes quelantes de hierro muchas bacterias patógenas serían incapaces de iniciar la infección debido a la limitación de hierro (*véanse* Secciones 21.7 y 21.8).

En las aguas marinas, el hierro es prácticamente indetectable (las aguas oceánicas superficiales contienen típicamente sólo unos cuantos *picogramos* de hierro por mililitro) y se han encontrado bacterias marinas que producen sideróforos estructuralmente complejos capaces de secuestrar el hierro presente en concentraciones tan bajas. Estos sideróforos poseen una región peptídica que compleja el Fe^{3+} y una región lipídica que se asocia con la membrana celular. Compuestos como la *aquachelina* (Figura 1.5*c*) unen hierro, se agregan en micelas, y luego transportan el hierro a la célula. Algunos procariotas pueden crecer en ausencia total de hierro. Por ejemplo, las bacterias *Lactobacillus plantarum* y *Borrelia burgdorferii* (esta última es el agente etiológico de la enfermedad de Lyme, *véase* Sección 27.4) no contienen hierro. El Mn^{2+} sustituye en estas bacterias al hierro como componente metálico de las enzimas que normalmente contienen Fe^{2+}.

Micronutrientes (elementos traza)

Aunque los micronutrientes se requieren en muy pequeñas cantidades son tan importantes para el funcionamiento celular como los macronutrientes. Los micronutrientes son metales, muchos de los cuales tienen una función estructural en varias enzimas (los catalizadores de las células). La Tabla 5.2 resume los principales micronutrientes en los sistemas vivos y las enzimas que los contienen.

Debido a que la necesidad de estos elementos traza es muy pequeña en cuanto a su concentración, con frecuencia no es necesario añadirlos a los medios de cultivo para cultivar microorganismos en el laboratorio. No obstante, si un medio de cultivo contiene compuestos muy puros, disueltos en agua destilada de elevada pureza, puede darse una deficiencia en algún elemento traza. En tales casos, se añade al medio una pequeña cantidad de una solución de metales traza (Tabla 5.2) a fin de suministrar los metales necesarios.

Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son compuestos *orgánicos*que, como los micronutrientes, se necesitan en muy pequeñas cantidades y sólo por algunas células. Los factores de crecimiento son vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas. Aunque la mayoría de los microorganismos son capaces de sintetizar estos compuestos, en algunos casos es necesario suministrarlos en el medio de cultivo.

TABLA 5.3 Factores de crecimiento: vitaminas y sus funciones

Vitamina	Función
Ácido *p*-aminobenzoico	Precursor del ácido fólico
Ácido fólico	Metabolismo de compuestos de un carbono; transferencia de grupos metilo
Biotina	Biosíntesis de ácidos grasos; β-descarboxilaciones; algunas reacciones de fijación de CO_2
Cobalamina (B_{12})	Reducción y transferencia de restos monocarbonados; síntesis de desoxirribosa
Ácido lipoico	Transferencia de grupos acilo en la descarboxilación del piruvato y α-cetoglutarato
Ácido nicotínico (niacina)	Precursor del NAD^+ (*véase* Figura 5.10); transferencia de electrones en reacciones de oxidación-reducción
Ácido pantoténico	Precursor de la coenzima A; activación del acetilo y derivados acilados
Riboflavina	Precursor del FMN (*véase* Figura 5.15), FAD en flavoproteínas implicadas en el transporte de electrones
Tiamina (B_1)	α-Descarboxilaciones; transcetolasa
Vitaminas B_6 (grupo piridoxal-piridoxamina)	Transformaciones de aminoácidos y cetoácidos
Grupo vitamina K; quinonas	Transporte de electrones; síntesis de esfingolípidos
Hidroxamatos	Compuestos que unen hierro; solubilización y transporte del hierro al interior celular

Las vitaminas son los factores de crecimiento que se necesitan con mayor frecuencia. Muchas vitaminas funcionan formando parte de coenzimas (*véanse*, por ejemplo, las Figuras 5.10, 5.12 y 5.15) como se indica en la Tabla 5.3. La mayor parte de los microorganismos son capaces de sintetizar todos los componentes de sus coenzimas, pero algunos no lo son y necesitan que se le suministren ciertas partes de estos coenzimas en forma de vitaminas. Las bacterias lácticas, tales como los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y otros (*véase* Sección 12.19), destacan por sus requerimientos vitamínicos complejos, mucho más amplios que los humanos (*véase* Tabla 5.4). Las principales vitaminas requeridas por los microorganismos son tiamina (vitamina B_1), biotina, piridoxina (vitamina B_6) y piridoxina (vitamina B_{12}).

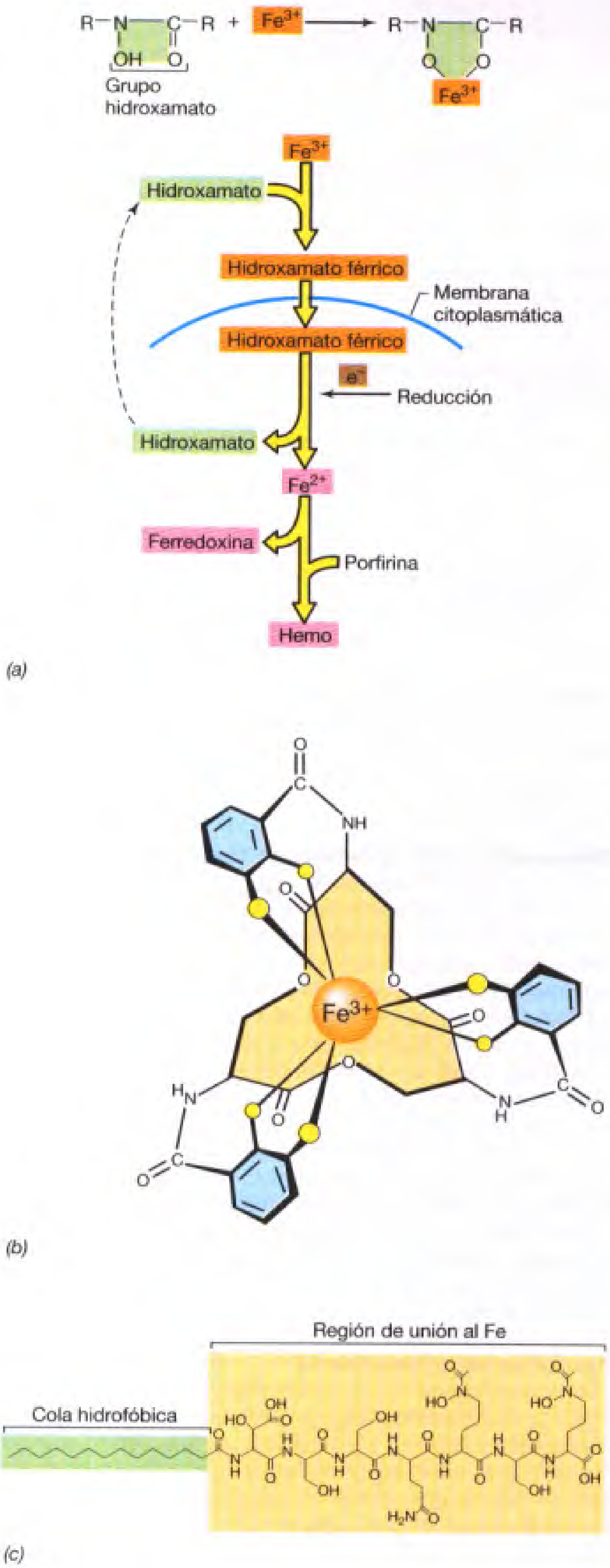


Figura 5.1 Agentes quelantes de hierro producidos por microorganismos. (a) Hidroxamato. El hierro se une como Fe^{3+} y se libera dentro de la célula como Fe^{2+}. El hidroxamato sale luego de la célula y reanuda el ciclo. (b) Enterobactina férrica de *Escherichia coli*. Los átomos de oxígeno de cada molécula de catecol se indican en amarillo. (c) El sideróforo peptídico aquaquelina.

✓ *5.1 Revisión de conceptos*

Los centenares de compuestos químicos presentes en una célula viva se forman a partir de precursores llamados nutrientes. Los elementos que se necesitan en grandes cantidades se denominan macronutrientes, mientras que los metales y los compuestos orgánicos que se requieren en pequeñas cantidades se denominan micronutrientes y factores de crecimiento, respectivamente.

- ✓ ¿Qué dos clases de moléculas contienen la mayor parte del *nitrógeno* en una célula?
- ✓ ¿Por qué un elemento como el Co^{2+} se considera un *micro*nutriente y un elemento como el C un *macro*nutriente?
- ✓ ¿Qué funciones desarrolla el hierro en el metabolismo celular?
- ✓ ¿Qué mecanismos son los responsables de la captación del hierro?

5.2 Medios de cultivo

La explicación anterior sobre la nutrición microbiana se resume viendo la composición química de los medios de cultivo (Tabla 5.4). Los **medios de cultivo** son las soluciones nutritivas que se usan en el laboratorio para el cultivo de los microorganismos. En microbiología, se usan dos tipos generales de medios de cultivo: los **químicamente definidos** y los **complejos** (o no definidos). Los medios definidos se preparan añadiendo cantidades precisas de compuestos orgánicos o inorgánicos purificados a un volumen en agua destilada. Por tanto, se sabe la *composición química exacta* de un medio definido. Sin embargo, en muchos casos la composición exacta de un medio no es importante. Los medios complejos pueden ser entonces adecuados o incluso ventajosos por varias razones. A menudo, los medios complejos emplean hidrolizados de caseína (la proteína de la leche), carne, soja, levaduras u otras sustancias muy nutritivas (pero sin embargo, no definidas químicamente). Tales hidrolizados están disponibles comercialmente en forma de polvo y pueden ser pesados con facilidad y disueltos en agua destilada para preparar un medio. No obstante, una limitación importante al usar un medio complejo es que no se puede controlar su composición nutritiva exacta.

Requerimientos nutricionales y capacidad biosintética

La Tabla 5.4 muestra los ingredientes de tres medios de cultivo, dos definidos y uno complejo. El medio complejo es el más fácil de preparar y permite un buen crecimiento de cualquiera de los organismos indicados en la tabla, la bacteria entérica *Escherichia coli* o la bacteria láctica *Leuconostoc mesenteroides* (una bacteria «quisquillosa», por sus exigencias nutritivas). El medio definido más sencillo permite un buen crecimiento de *E. coli*, pero no de *L. mesenteroides*; el cultivo de este último en medio definido requiere la adición de varios nutrientes orgánicos y de factores de crecimiento que no son necesarios para *E. coli* (Tabla 5.4). Teniendo esto en

TABLA 5.4 Ejemplos de medios de cultivo para microorganismos con requerimientos nutricionales simples y complejos[a]

Medio definido para *Escherichia coli*	**Medio definido para *Leuconostoc mesenteroides***	**Medio complejo tanto para *E. coli* como para *L. mesenteroides***
K_2HPO_4 7 g KH_2PO_4 2 g $(NH_4)_2SO_4$ 1 g $MgSO_4$ 0,1 g $CaCl_2$ 0,02 g Glucosa 4-10 g Elementos traza (Fe, Co, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo) de 2-10 µg cada uno Agua destilada 1 000 ml pH 7	K_2HPO_4 0,6 g KH_2PO_4 0,6 g NH_4Cl 3 g $MgSO_4$ 0,1 g Glucosa 25 g Acetato sódico 20 g Aminoácidos (alanina, arginina, asparragina, aspartato, cisteína, glutamato, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina) 100-200 µg de cada uno Purinas y pirimidinas (adenina, guanina, uracilo, xantina) 10 mg de cada una Vitaminas (biotina, folato, ácido nicotínico, piridoxal, piridoxamina, piridoxina, riboflavina, tiamina, pantotenato, ácido *p*-aminobenzoico) 0,01-1 mg de cada una Elementos traza (*véase* la primera columna) 2-10 µg de cada uno Agua destilada 1 000 ml pH 7	Glucosa 15 g Extracto de levadura 5 g Peptona 5 g KH_2PO_4 2 g Agua destilada 1 000 ml pH 7
 (a)		 *(b)*

---

[a] Las fotos son tubos del medio definido (a) y del medio complejo descrito (b). Nótese que el medio complejo está coloreado por los extractos orgánicos e hidrolizados que contiene. *Fotos cedidas por Cheryl L. Broadie y John Vercillo, Southern Illinois University at Carbondale.*

cuenta, cabe preguntarse cuál de estos organismos tendrá mayor capacidad biosintética. La respuesta es obvia: *E. coli*, pues su capacidad para crecer en un medio simple definido significa que es capaz de sintetizar *todos* sus componentes celulares a partir de una única fuente de carbono, en este caso la glucosa (Tabla 5.4). Por el contrario, *L. mesenteroides* requieremúltiples factores de crecimiento, lo que indica una capacidad de biosíntesis limitada. Las complejas necesidades nutricionales de *L. mesenteroides* se pueden suministrar preparando un medio definido como el que se indica en la Tabla 5.4 (lo cual llevaría bastante tiempo) o usando el medio complejo indicado en la misma tabla, que puede prepararse de forma rápida.

Cuando se examinan los ingredientes de medios de cultivo como los que se ejemplifican en la Tabla 5.4, es importante tener en cuenta que *diferentes microorganismos pueden poseer requerimientos nutricionales muy diferentes*. Por tanto, para el cultivo correcto de un microorganismo determinado es necesario conocer sus exigencias nutritivas y suministrarlas en los medios de cultivo con los nutrientes esenciales en la forma y proporción adecuadas. Si se toma el debido cuidado en la preparación de los medios de cultivo, resulta relativamente fácil cultivar en el laboratorio muchos tipos diferentes de microorganismos. Explicaremos los procedimientos usados para cultivar microorganismos a continuación.

✓ 5.2 Revisión de conceptos

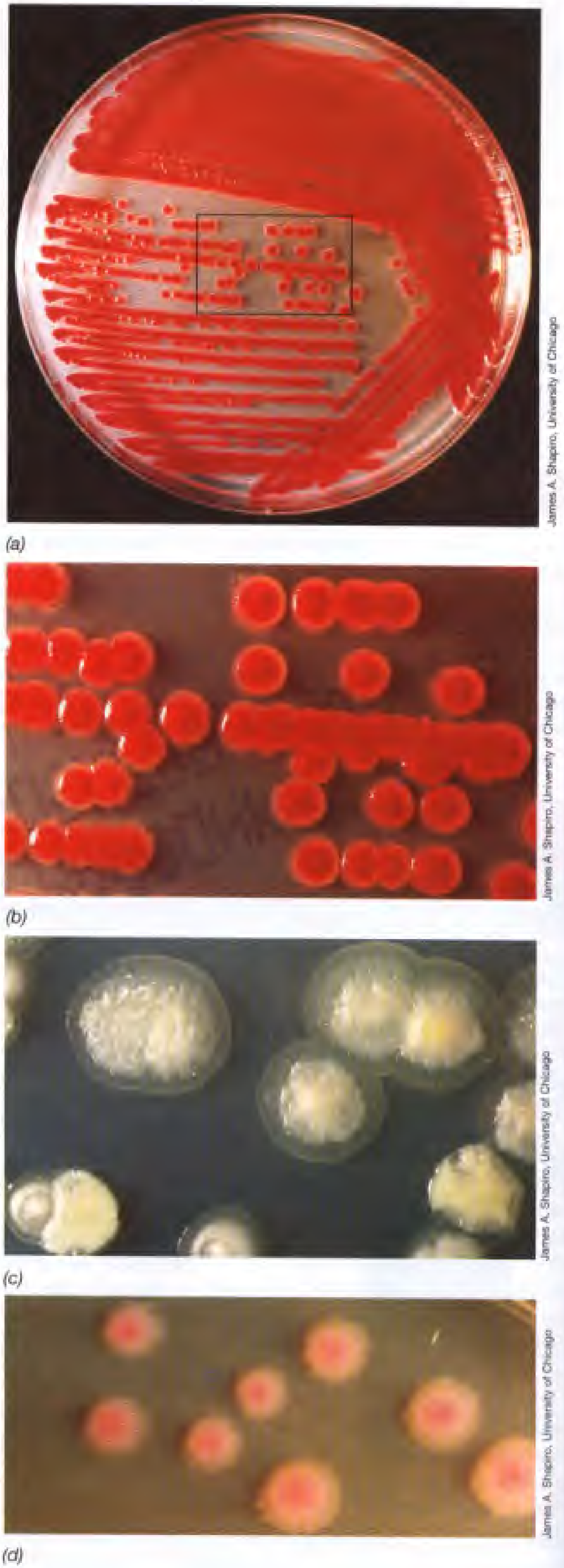
Los medios de cultivo satisfacen las necesidades nutritivas de los microorganismos y pueden ser químicamente definidos o complejos (no definidos).

✓ ¿Por qué es más fácil el cultivo rutinario de *Leuconostoc mesenteroides* en un medio complejo que en un medio definido?

✓ De los medios mostrados en la Tabla 5.4, señale en qué medio definido o complejo crecería más rápido *Escherichia coli* y por qué.

5.3 Cultivo de microorganismos en el laboratorio

Una vez que ha sido preparado un medio de cultivo, puede ser inoculado (es decir, se le añaden organismos) y a continuación incubado en condiciones que favorezcan el crecimiento microbiano. En general, se tratará del crecimiento de un **cultivo axénico o puro**, esto es, de un cultivo que contiene sólo un único tipo de microorganismo. Para obtener y



James A. Shapiro, University of Chicago

Figura 5.2 Ejemplos de colonias bacterianas. Las colonias son masas visibles de células que se forman por la división de una o varias células. El tamaño, forma, textura y color de una colonia es propio de cada organismo. Dependiendo del tamaño de las células y de su disposición dentro de la colonia cada una de ellas puede tener un número muy variable de células pero *mil millones* de células individuales es bastante frecuente. (a) *Serratia marcescens* cultivada en agar MacConkey. (b) Aumento de las colonias anteriores. (c) *Pseudomonas aeruginosa* cultivada en agar Tripticasa-Soja. (d) *Shigella flexneri* cultivada en agar MacConkey.

mantener un cultivo axénico o puro es esencial evitar la entrada en él de otros organismos. Los organismos no deseados, llamados *contaminantes*, son muy ubicuos (como Pasteur puso de manifiesto hace más de 125 años, *véase* Sección 1.5), por lo que se han diseñado técnicas microbiológicas para evitarlos. Un método importante para obtener cultivos axénicos o puros y para asegurar la pureza de un cultivo es el uso de medios sólidos en placas de Petri.

Medios de cultivo líquidos versus medios de cultivo sólidos

Hasta ahora sólo hemos considerado la preparación de medios de cultivo líquidos, como los medios definidos y complejos que aparecen en los tubos de la Tabla 5.4. Sin embargo, los medios de cultivo se preparan con frecuencia en forma semisólida o sólida mediante la adición al medio líquido de un agente solidificante. Los medios sólidos inmovilizan a las células, permitiéndoles crecer y formar masas aisladas visibles llamadas *colonias* (Figura 5.2). Las colonias bacterianas pueden ser de forma y tamaño variable dependiendo del organismo, las condiciones del cultivo, el suministro de nutrientes (como la cantidad de oxígeno presente), y otros parámetros fisiológicos. Algunas bacterias producen pigmentos que dan color a las colonias (Figura 5.2). Independientemente de su posible pigmentación, las colonias permiten al microbiólogo reconocer la pureza del cultivo; las placas que contengan más de un tipo de colonia no fueron sembradas con un cultivo axénico o puro. De este modo, la placa de Petri se ha venido utilizando por más de un siglo como criterio para establecer la pureza en los cultivos (*véase* Sección 1.5).

Los medios sólidos se preparan igual que los líquidos salvo que, antes de esterilizar los medios, se les añade *agar* como agente gelificante, normalmente al 1,5%. El agar se funde durante el proceso de esterilización y el medio fundido se vierte sobre placas de cristal o de plástico, y se deja que solidifique antes de usarse (Figura 5.2).

Técnica aséptica

Dado que los microorganismos son ubicuos, los medios de cultivo deben ser esterilizados antes de usarse. Para la mayoría de los medios de cultivo esto se realizapor calor, habitualmente mediante calor húmedo en un gran recipiente a presión llamado *autoclave*. Los principios y operaciones del autoclave se comentarán más adelante así como otros métodos de esterilización (*véase* Sección 20.1).

Una vez preparado un medio de cultivo estéril, puede recibir un *inóculo* de un cultivo puro y cultivarlo nuevamente. Esto requiere el uso de la **técnica aséptica**. La técnica aséptica consiste en una serie de procedimientos que evitan la contaminación durante la manipulación de los cultivos y de los medios de cultivo estériles (Figura 5.3 y 5.4). Su aprendizaje es esencial para tener éxito en el laboratorio de microbiología y representa uno de los primeros métodos que tiene que dominar el microbiólogo. El problema más común es la contaminación ambiental a través del aire, ya que éste siempre contiene polvo en suspensión que generalmente lleva una comunidad de microorganismos. Cuando las placas o tubos se abren deben manejarse de tal modo que los contaminantes del aire no penetren (Figura 5.3 y 5.4). La transferencia aséptica de un cultivo desde un tubo con medio a otro, se realiza habitualmente con el asa o aguja de siembra previamente esterilizada a la llama por incandescencia (Figura 5.3). Los cultivos en los que ha habido crecimiento se pueden trans-

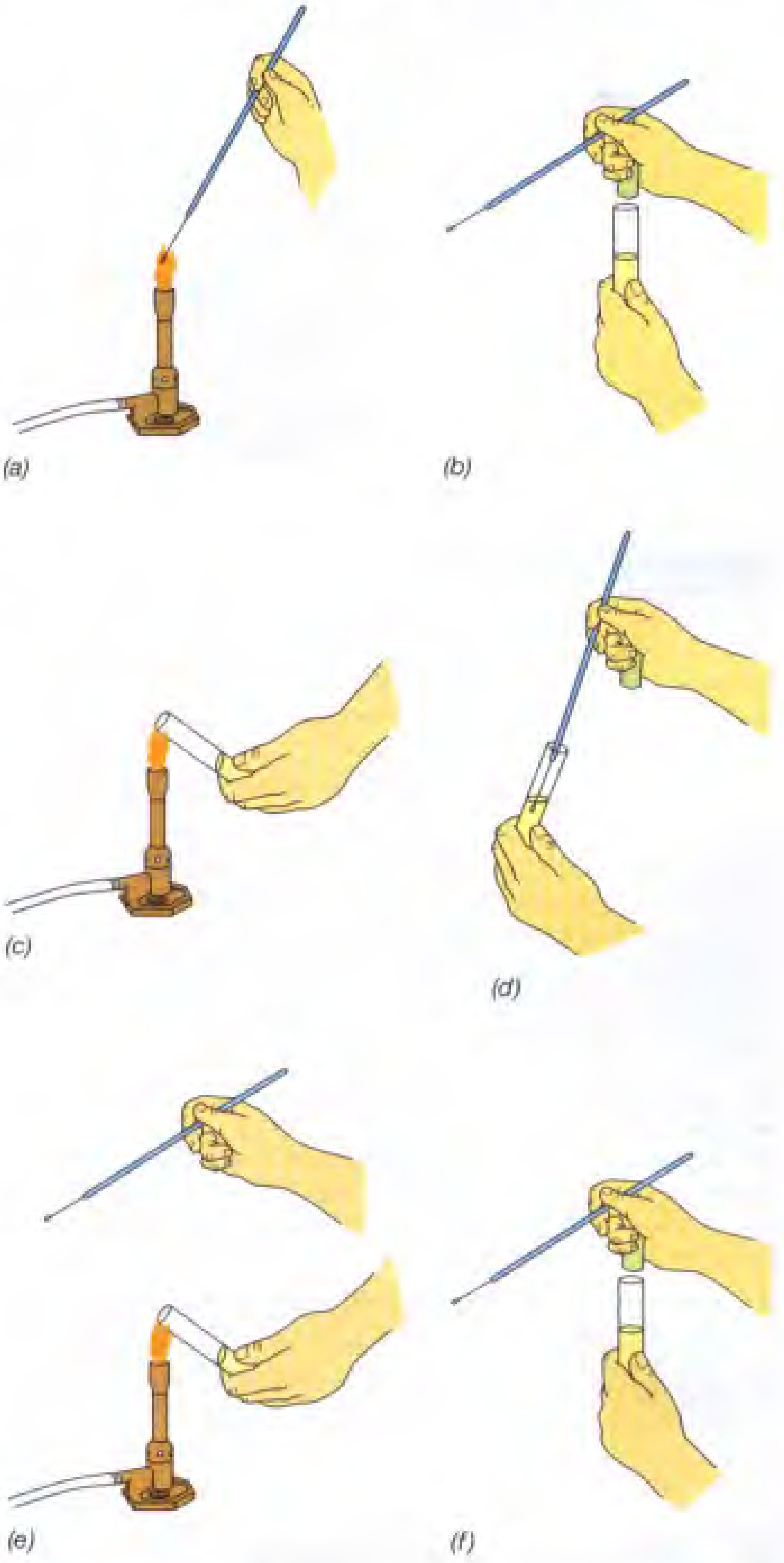
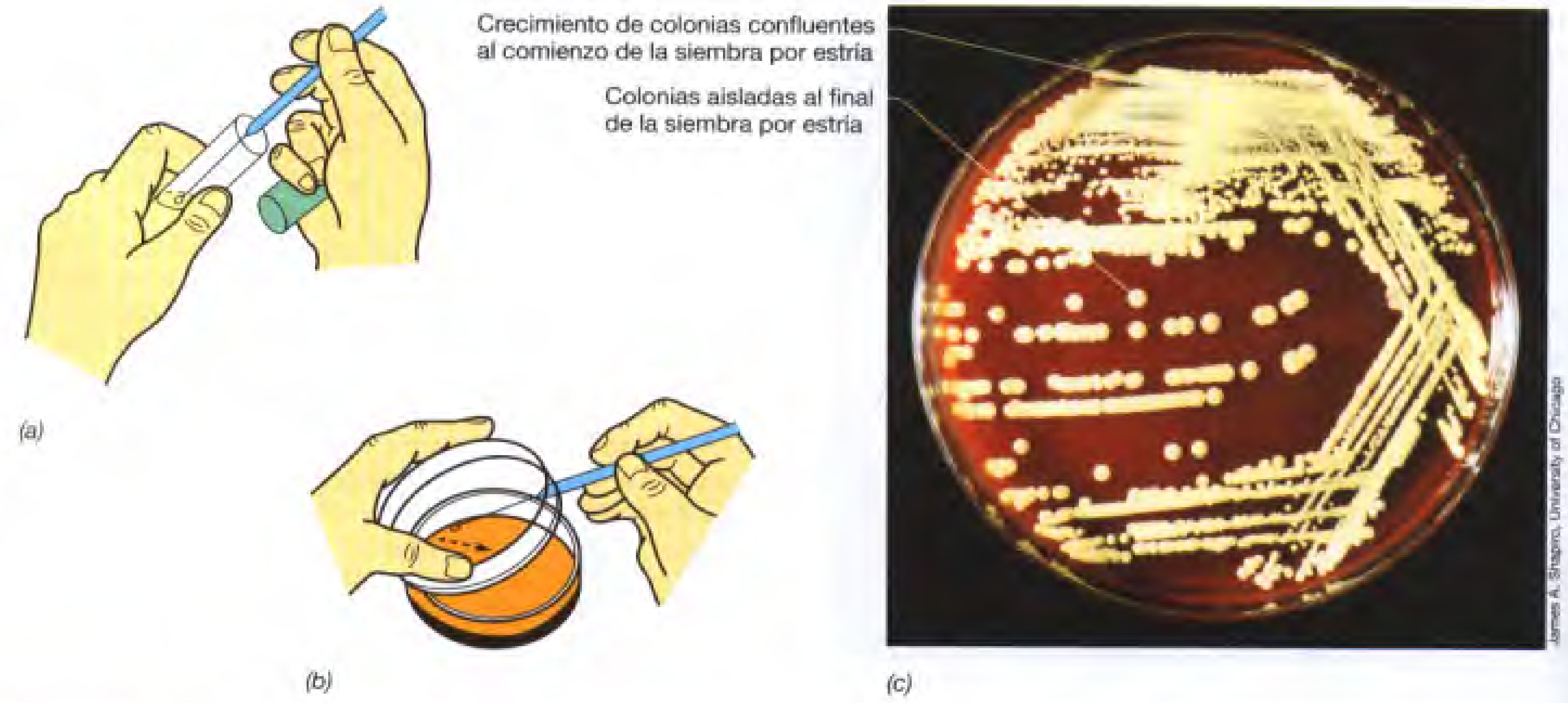


Figura 5.3 Transferencia aséptica. (a) El asa de siembra se calienta hasta la incandescencia y se enfría brevemente al aire. (b) El tubo se destapa. (c) Se pasa el extremo del tubo por la llama. (d) Se extrae la muestra con el asa esterilizada. (e) Tras tomar la muestra con el asa, se vuelve a flamear el extremo del tubo y la muestra se deposita en un medio estéril. (f) Se vuelve a tapar el tubo. El asa se recalienta de nuevo antes de finalizar su utilización.


Crecimiento de colonias confluentes al comienzo de la siembra por estría
Colonias aisladas al final de la siembra por estría
(a)
(b)
(c)

James A. Shapiro, University of Chicago

Figura 5.4 Método de hacer una extensión en placa para obtener cultivos axénicos o puros. (a) Se esteriliza el asa y luego se toma una muestra de inóculo del tubo. (b) Se realiza una siembra por estría sobre una placa de agar con medio estéril, extendiendo bien los organismos. Después de una estría inicial se hacen estrías subsiguientes en ángulo, y al final se vuelve a esterizar el asa. (c) Aspecto de la placa sembrada tras incubación. Se trata de colonias de la bacteria *Micrococcus luteus* cultivadas en placas de agar sangre. De las colonias que crecen aisladas se pueden obtener normalmente cultivos axénicos o puros.

ferir luego a la superficie de placas con agar (Figura 5.4), donde se desarrollarán colonias como resultado del crecimiento y división de las células aisladas que han sido sembradas. La toma y resiembra por extensión de una colonia aislada es un método idóneo para obtener cultivos axénicos o puros a partir de mezclas complejas que contienen muchos organismos diferentes.

✓ 5.3 Revisión de conceptos

En el laboratorio, los microorganismos se pueden cultivar en medios de cultivo que contienen los nutrientes necesarios. La obtención de cultivos axénicos o puros requiere la puesta en práctica de técnicas asépticas.

✓ ¿Qué significa la palabra *estéril*? ¿Qué ocurriría si los medios de cultivo no se esterilizaran tras su preparación?

✓ ¿Por qué es necesaria la técnica aséptica en la obtención de cultivos axénicos o puros en el laboratorio?

II ENERGÍA Y ENZIMAS

En el Capítulo 2 consideramos la existencia de diferentes tipos de microorganismos en función de su fuente de energía, *quimioorganotrofos*, *quimiolitotrofos* y *fototrofos* (*véase* Sección 2.4). Sea cual sea su modo de vida, todo microorganismo debe ser capaz de obtener energía de compuestos químicos o de la luz y, además, conservar la energía como ATP. Vamos a considerar ahora los principios de conservación de la energía utilizando algunas leyes sencillas de la química y de la física que nos ayudarán a su comprensión, y consideraremos a continuación la acción de las enzimas, que son los biocatalizadores celulares.

5.4 Bioenergética

La **energía** se define como la capacidad de realizar un trabajo. En microbiología, la energía se mide normalmente en *kilojulios* (kJ), una unidad de energía calorífica. Las reacciones químicas se acompañan de cambios de energía. Aunque en toda reacción química se pierde algo de energía en forma de calor, lo que nos interesa en microbiología es considerar la **energía libre** (abreviada como G), que se define como la energía liberada *que es utilizable para realizar un trabajo*. El cambio en energía libre durante una reacción se expresa como $\Delta G^{0\prime}$, donde el símbolo Δ debe leerse como «cambio en». Los índices «cero» y «apóstrofe» indican que un valor dado de energía libre ha sido obtenido bajo condiciones estándar o habituales: a pH 7, 25°C y con todos los reactivos y productos a una concentración inicial de 1 *M*[*].

---

[*] Los cálculos de energía libre en condiciones estándar son aproximaciones de los cambios en energía libre que realmente ocurren en la naturaleza, a pesar de que en la naturaleza raramente se dan concentraciones 1 *M* de nutrientes. Aunque los valores de $\Delta G^{0\prime}$ son estimaciones razonables, más adelante veremos que las concentraciones reales de productos y reactivos pueden alterar en ocasiones la bioenergética de las reacciones de modo notable (*véanse* Secciones 17.21 y 19.10). Estos temas también se analizan con más detalle en el Apéndice 1.

Si en la reacción:

$$A + B \rightarrow C + D$$

el valor de $\Delta G^{0\prime}$ es *negativo*, entonces significa que la reacción ocurre espontáneamente con liberación de energía; energía que la célula será capaz de conservar en forma de ATP. Tales reacciones se llaman **exotérmicas**. Sin embargo, si $\Delta G^{0\prime}$ es *positiva* la reacción requiere energía y estas reacciones se denominan **endotérmicas**. En resumen, desde el punto de vista de la célula microbiana, las reacciones exotérmicas producen energía, mientras que las reacciones exotérmicas requieren energía.

Energía libre de formación y cálculo de $\Delta G^{0\prime}$

Para calcular la energía libre que produce una reacción es necesario saber la energía libre de los reaccionantes y de los productos. Ésta es la *energía libre de formación*, es decir, la energía liberada o requerida para la formación de una molécula determinada a partir de sus elementos constituyentes. Por convenio, el valor de la energía libre de formación (G^0_f) para los elementos (como el C, H_2, N_2) es cero. Si la formación de un *compuesto* a partir de sus elementos es exotérmica, entonces la energía libre de formación de ese compuesto es negativa (se libera energía), mientras que si la reacción es endotérmica (requiere energía) la energía libre de formación del compuesto es positiva.

La Tabla 5.5 recoge algunos ejemplos de energías libres de formación. Para la mayor parte de los compuestos G^0_f es *negativa*, lo que indica que los compuestos tienden a formarse espontáneamente a partir de los elementos. Sin embargo, el valor de G^0_f positivo para el óxido nitroso (+104,2 kJ/mol) significa que esta molécula no se forma espontáneamente, sino que se descompone con facilidad en nitrógeno y oxígeno. En el Apéndice 1, se muestran las energías libres de formación de una variedad de compuestos con interés en microbiología.

Mediante la utilización de las energías libres de formación es posible calcular el *cambio* en energía libre que ocurre en una reacción determinada. Por ejemplo, para una reacción simple como $A + B \rightarrow C + D$, el valor de $\Delta G^{0\prime}$ se calcula restando la *suma* de las energías libres de formación de los reaccionantes (A y B) de la de los productos (C y D). Por tanto,

$$\Delta G^{0\prime} \text{ de } A + B \rightarrow C + D = G^0_f[C + D] - G^0_f[A + B]$$

La frase «los productos menos los reaccionantes» resume los pasos necesarios para calcular los cambios en energía libre durante las reacciones químicas. No obstante, primero es necesario igualar químicamente la reacción antes de realizar los cálculos de energía libre. En el Apéndice 1, se detallan los pasos a seguir para calcular las energías libres de cualquier reacción hipotética.

TABLA 5.5 Energía libre de formación de algunos compuestos de interés biológico

Compuesto	Energía libre de formación[a]
Agua (H_2O)	−237,2
Dióxido de carbono (CO_2)	−394,4
Hidrógeno gaseoso (H_2)	0
Oxígeno gaseoso (O_2)	0
Amoniaco (NH_4^+)	−79,4
Óxido nitroso (N_2O)	+104,2
Acetato ($C_2H_3O_2^-$)	−369,4
Glucosa ($C_6H_{12}O_6$)	−917,3
Metano (CH_4)	−50,8
Metanol (CH_3OH)	−175,4

[a] Los valores de energía libre (G_f^0) se dan en *kJ/mol*.

✓ 5.4 Revisión de conceptos

Las reacciones químicas celulares implican cambios en energía que se expresan en kJ. Una reacción química puede ocurrir con liberación de energía libre (exotérmica) o con consumo de energía libre (endotérmica).

- ✓ ¿Qué es la energía libre?
- ✓ En general, las reacciones *catabólicas*, ¿son exotérmicas o endotérmicas?
- ✓ Usando los datos de la Tabla 5.5, calcule el valor de $\Delta G^{0\prime}$ para la reacción $CH_4 + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow CH_3OH$.

5.5 Catálisis y enzimas

La determinación de la energía libre nos indica sólo si en una determinada reacción se libera o se requiere energía, pero no nos dice nada acerca de la *velocidad* de la reacción. Consideremos la formación de agua a partir de oxígeno e hidrógeno gaseosos. La energía de esta reacción es muy favorable: $H_2 + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O$, con un valor de $\Delta G^{0\prime} = -237$ kJ. Sin embargo, si simplemente mezclásemos O_2 e H_2, la formación de agua no sería detectable en muchos años. Esto se debe a que la reordenación de los átomos de oxígeno y de hidrógeno para formar agua requiere la rotura previa de los enlaces químicos de los reaccionantes. Tal rotura requiere energía y esa energía se designa como **energía de activación**. La energía de activación es la cantidad de energía que se necesita para llevar todas las moléculas de una reacción química a un estado reactivo. El diagrama de la Figura 5.5 representauna reacción que tiene lugar con una liberación neta de energía libre (es decir, una reacción exotérmica).

Enzimas

El concepto de energía de activación nos lleva al concepto de catálisis. Un **catalizador** es una sustancia que *disminuye* la energía de activación de una reacción y, por consiguiente, *aumenta* la velocidad de una reacción. Los catalizadores facilitan las reacciones pero ellos mismos no se consumen ni se modifican durante la reacción. Es importante destacar que los catalizadores no intervienen en la energía o en el equilibrio de una reacción, sino que afectan sólo a la *velocidad* a la que esas reacciones ocurren.

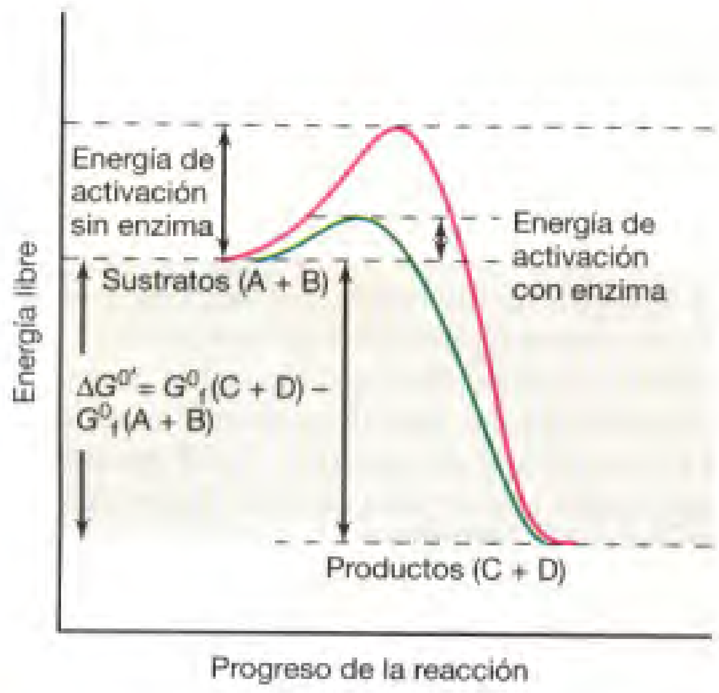


Figura 5.5 Desarrollo de una hipotética reacción exotérmica: A + B → C + D y concepto de energía de activación. Las reacciones químicas pueden no ocurrir espontáneamente incluso aunque liberen energía, ya que los reactivos deben activarse previamente. Una vez que la activación tiene lugar, la reacción ocurre espontáneamente. Los catalizadores, tal como las enzimas, rebajan la energía de activación requerida.

En los organismos vivos, la mayoría de la reacciones no tendrían lugar a una velocidad apreciable sin los catalizadores. Los catalizadores de las reacciones biológicas son proteínas llamadas **enzimas**. Las enzimas son muy específicas para las reacciones que catalizan. Es decir, cada enzima cataliza solamente un *único tipo* de reacción química o, en el caso de algunas enzimas, una *clase* de reacciones estrechamente relacionadas. Esta especificidad se debe a la estructura tridimensional de la molécula de la enzima. En una reacción catalizada enzimáticamente, la enzima se combina temporalmente con el reaccionante, que se denomina **sustrato** (S) de la enzima, para formar un **complejo enzima-sustrato**. Luego, cuando ocurre la reacción, el **producto** (P) se libera y la enzima (E) vuelve a su estado original:

$$E + P \rightleftharpoons E - S \rightleftharpoons E + P$$

Por lo general, la enzima es mucho más grande que el sustrato y la combinación enzimasustrato suele depender de enlaces débiles tales como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas (*véase* Sección 3.1). La pequeña porción de la enzima que se une al sustrato constituye el **sitio activo** de la enzima.

Catálisis enzimática

El poder catalítico de las enzimas es impresionante. Las enzimas pueden incrementar de 10^8 a 10^{20} veces la velocidad a la que las reacciones químicas ocurrirían de modo espontáneo. Para catalizar una reacción específica, una enzima debe realizar dos cosas: (1) unirse al sustrato adecuado y (2) colocar el sustrato de modo preciso para que interaccione con los grupos catalíticos del sitio activo de la enzima. La unión de la enzima y el sustrato acarrea la formación

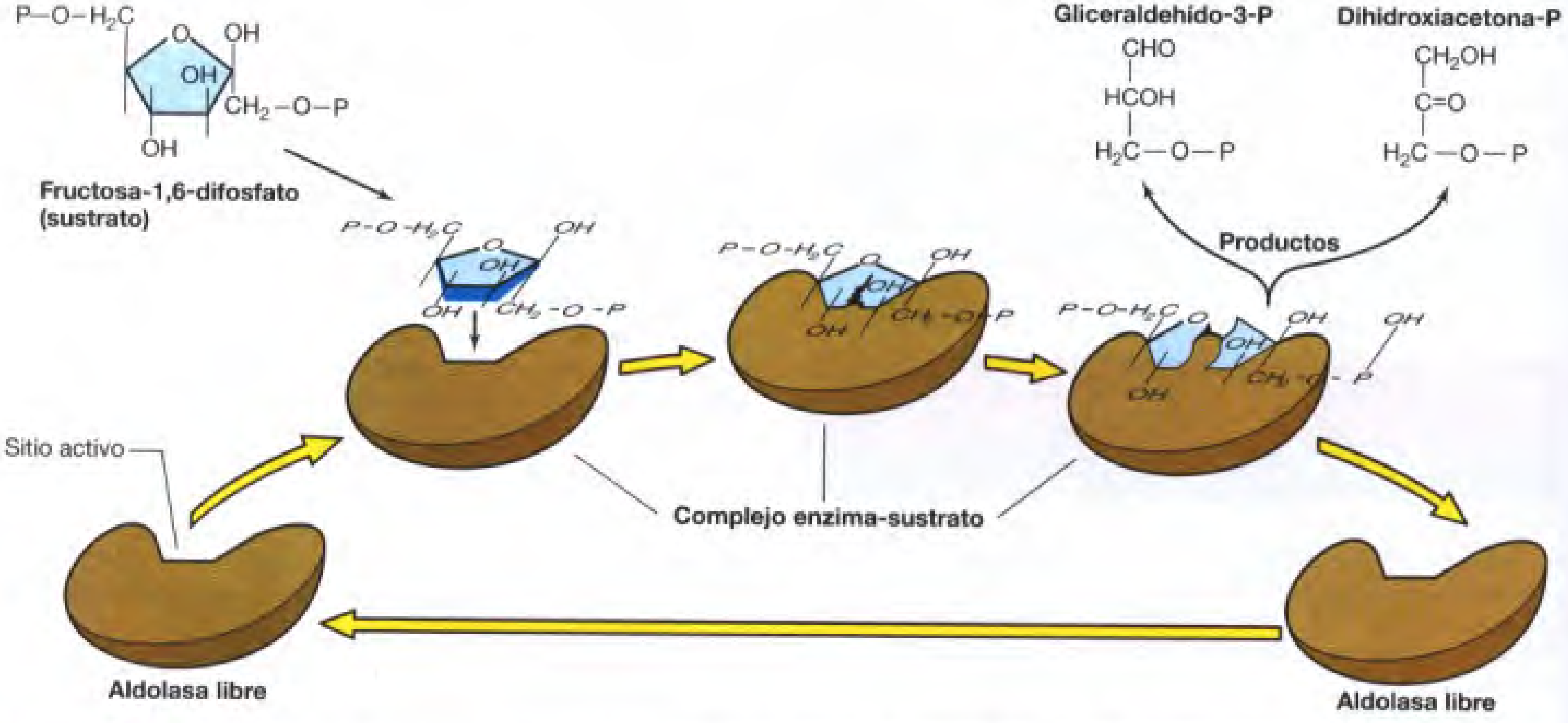


Figura 5.6 Ciclo catalítico de una enzima tomando como ejemplo la fructosa difosfato aldolasa. Esta enzima cataliza la reacción: fructosa-1,6-difosfato → gliceraldehído-3-fosfato + dihidroxiacetona fosfato en la glucolisis (*véase* Figura 5.14). Después de la unión de la fructosa-1,6-bifosfato para formar el complejo enzima-sustrato, la conformación de la enzima resulta alterada, lo que introduce tensión en ciertos enlaces del sustrato que se rompe dando lugar a los dos productos de reacción.

del complejo enzima-sustrato (Figura 5.6). Esto permite alinear los grupos reactivos en enlaces específicos del sustrato(s). El resultado final de la formación del complejo enzima-sustrato es una disminución en la energía de activación necesaria para poner en marcha la reacción de conversión del sustrato(s) en su producto(s) (Figura 5.5). Estos pasos se presentan de forma esquemática en la Figura 5.6 para el caso de la enzima glicolítica *fructosa difosfato aldolasa* (*véase* Sección 5.10).

La reacción presentada en la Figura 5.5 es exotérmica porque la energía libre de formación del sustrato es mayor que la de su producto; es decir, la formación del producto tiene lugar con liberación de energía. Las enzimas pueden catalizar también reacciones que requieren energía, convirtiendo sustratos pobres en energía en productos ricos en energía. En este caso, no sólo debe superarse la energía de activación, sino que se debe aportar al sistema suficiente energía para elevar el nivel energético del sustrato hasta el de los productos. En teoría, la acción de las enzimas es reversible pero en la práctica, las enzimas que catalizan reacciones altamente exotérmicas o endotérmicas lo hacen de manera unidireccional. Si durante el metabolismo celular se necesita invertir una reacción exotérmica particular, frecuentemente esa reacción es llevada acabo por una enzima diferente.

Estructura de las enzimas

Las enzimas son proteínas, es decir, polímeros de aminoácidos (*véanse* Secciones 3.7 y 3.8). Cada enzima tiene una forma tridimensional específica. La disposición lineal de los aminoácidos en la estructura primaria se pliega y se dobla adoptando una configuración específica que constituye la estructura secundaria y la terciaria. Esta especificidad le confiere propiedades físicas y de unión determinadas. La conformación precisa de una enzima puede observarse más fácilmente en modelos computerizados (Figura 5.7). En este ejemplo correspondiente a la *lisozima*, enzima que rompe el peptidoglicano (*véase* Sección 4.8), el lugar donde se une al sustrato (el sitio activo) es la amplia hendidura.

Muchas enzimas contienen pequeñas moléculas no proteicas que participan en la función catalítica, pero que no se pueden considerar como sustratos en el sentido habitual. Estas moléculas asociadas se dividen en dos categorías, *grupos prostéticos* y *coenzimas*, dependiendo de la naturaleza de su asociación con la enzima. Los **grupos prostéticos** se unen muy fuertemente a sus enzimas, por lo general de modo permanente. Un ejemplo de grupo prostético es el grupo hemo presente en los citocromos; los citocromos se describirán más tarde en este capítulo. Las **coenzimas** se unen más débilmente a las enzimas, y una sola molécula de coenzima puede unirse a diferentes enzimas a lo largo del tiempo durante el crecimiento. Las coenzimas sirven como transportadores o intermediarios de pequeñas moléculas de una enzima a otra. La mayor parte de las coenzimas derivan de vitaminas (*véase* Tabla 5.3).

Las enzimas se denominan según el sustrato al que se unen o según la reacción que catalizan, con la desinencia *-asa*. Así, la celul*asa* es una enzima que degrada la celulosa, la glucosa oxid*asa* cataliza la oxidación de la glucosa y la ribonucle*asa* descompone ácido ribonucleico. Existe una nomenclatura más formal que emplea un sistema de numeración específica para clasificar las enzimas con mayor precisión.

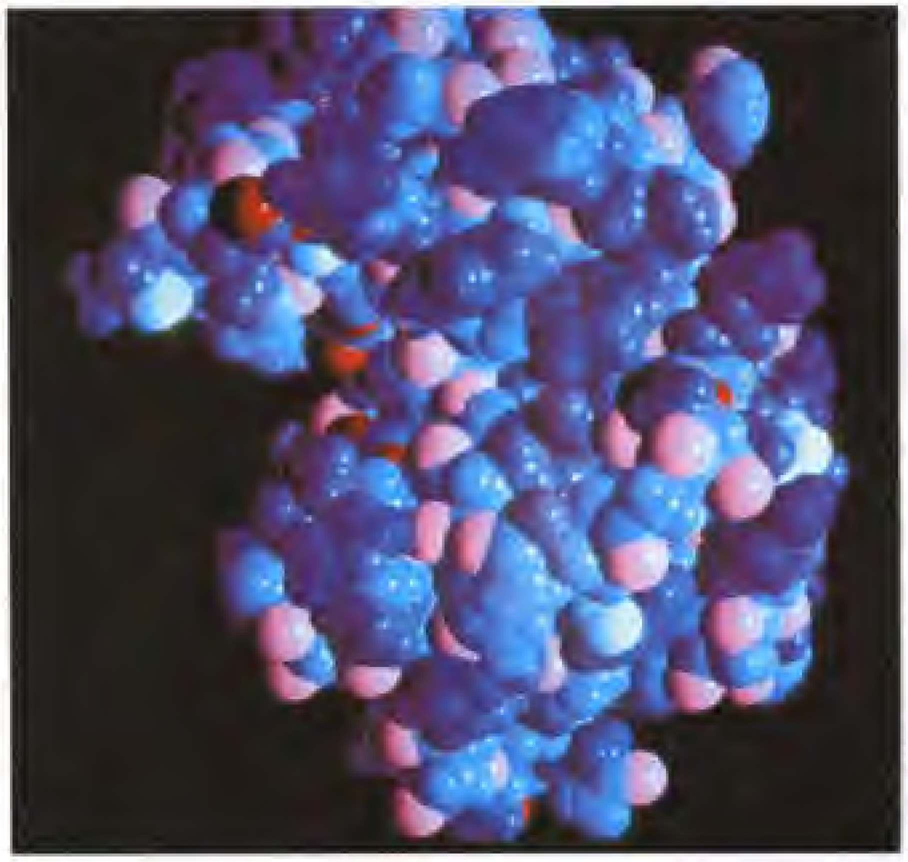


Figura 5.7 Modelo generado por computadora de la lisozima. El sitio activo de la enzima es la hendidura de la parte izquierda del modelo (*véase* Sección 4.8).

✓ 5.5 Revisión de conceptos

En una reacción química, los reaccionantes deben activarse previamente para que ocurra la reacción, y a menudo esto requiere un catalizador. Las enzimas son proteínas catalíticas que aceleran la velocidad de las reacciones bioquímicas. Las enzimas son altamente específicas con relación a las reacciones que catalizan, y tal especificidad reside en los modos de plegamiento del polipéptido(s) en la proteína.

- ✓ ¿Cuál es la función de un *catalizador*?
- ✓ ¿Qué *clase* de macromoléculas son las enzimas?
- ✓ ¿Por dónde se une una enzima a su sustrato?
- ✓ ¿Qué es la *energía de activación*?

III OXIDACIÓN–REDUCCIÓN Y COMPUESTOS DE ALTA ENERGÍA

En los sistemas biológicos, la conservación de la energía implica reacciones de oxidación-reducción. El resultado final de la energía liberada en estas reacciones es la producción de compuestos de *alta energía* como el ATP. A continuación, consideraremos reacciones de oxidación-reducción (reacciones redox) y los principales transportadores de electrones que se encuentran tanto en el citoplasma como en la membrana citoplasmática. Finalmente, examinaremos la naturaleza de los compuestos de alta energía que conservan la energía liberada en las reacciones de oxidación-reducción.

5.6 Oxidación-reducción

En los organismos, la utilización de la energía derivada de las reacciones químicas implica reacciones de **oxidación-reducción (redox)**. Químicamente, una oxidación se define como una *pérdida* de un electrón o varios electrones de una sustancia. A su vez, una reducción se define como la *ganancia* de un electrón (o electrones) por parte de una sustancia. En bioquímica —la química de las células— las oxidaciones y reducciones implican frecuentemente la transferencia no sólo de electrones sino de átomos completos de hidrógeno. Un átomo de hidrógeno (H) consta de un protón y un electrón. Cuando pierde su electrón, el átomo de hidrógeno se convierte en un *protón* (o ion hidrógeno, H^+). En ocasiones, necesitaremos distinguir entre las reacciones de oxidación-reducción que implican sólo electrones de las que implican sólo átomos de hidrógeno, pero estableceremos esta distinción en el momento apropiado (*véanse* Secciones 5.11 y 5.12).

Donadores y aceptores de electrones

En las reacciones oxidación-reducción, los electrones cedidos por un donador son aceptados por un aceptor. Por ejemplo, el gas hidrógeno puede liberar electrones y protones y oxidarse:

$$H_2 \rightarrow 2e^- + 2H^+$$

Sin embargo, los electrones no pueden existir como tales en solución; deben formar parte de átomos o moléculas. La ecuación anterior, por sí misma, no representa una reacción real. Es solamente la *mitad de una reacción* que requiere de una segunda reacción. Esto es debido a que para que ocurra cualquier *oxidación* debe producirse también una *reducción* acoplada. Así, por ejemplo, la oxidación del H_2 puede acoplarse a la reducción de sustancias muy diferentes, como el O_2, en una segunda reacción:

$$\frac{1}{2}O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O$$

Esta otra mitad de la reacción, que es una reducción, cuando se acopla a la oxidación del H_2 anterior, da lugar a la siguiente reacción total:

$$H_2 + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O$$

En reacciones de este tipo, nos referiremos a la sustancia *oxidada*, en este caso el H_2, como el **donador de electrones**, y a la sustancia *reducida*, en este caso el O_2, como el **aceptor de electrones** (Figura 5.8). La clave para entender las oxidaciones y reducciones biológicas consiste en tener en cuenta ambas semirreacciones, es decir, que debe existir siempre una reacción en la que intervenga un *donador* de electrones y otra en la que intervenga un *aceptor* de los mismos.

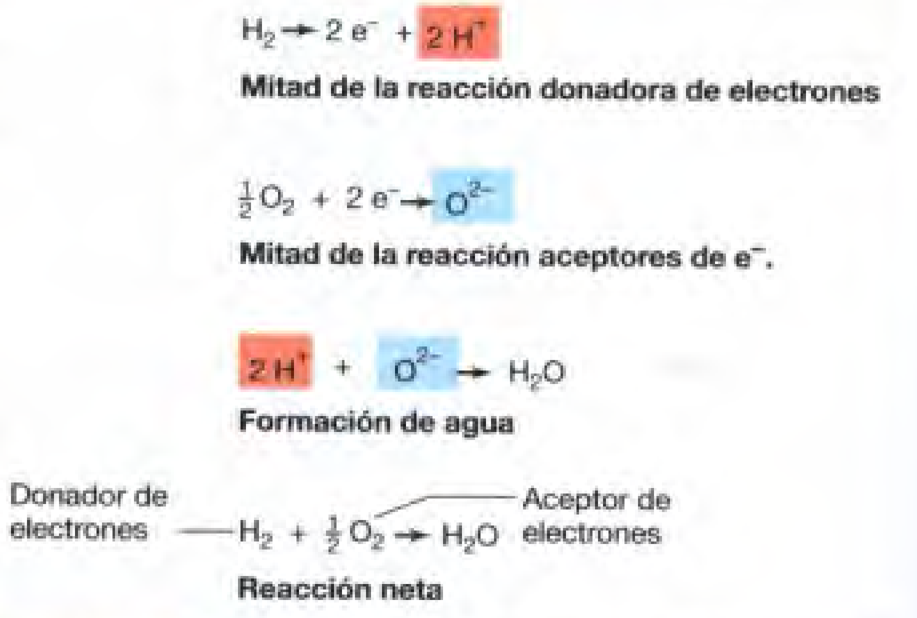

$H_2 \rightarrow 2e^- + 2H^+$
Mitad de la reacción donadora de electrones
$\frac{1}{2}O_2 + 2e^- \rightarrow O^{2-}$
Mitad de la reacción aceptores de e^-.
$2H^+ + O^{2-} \rightarrow H_2O$
Formación de agua
Donador de electrones
$H_2 + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O$
Aceptor de electrones
Reacción neta

Figura 5.8 Ejemplo de una reacciónde oxidación-reducción. La formación de H_2O a partir del donador de electrones H_2 y del aceptor de electrones O_2.

Potenciales de reducción

Las sustancias varían en cuanto a su tendencia a oxidarse o reducirse. Esta tendencia se expresa como el **potencial de reducción** (E_0', en condiciones estándar) de la sustancia. Este potencial se mide eléctricamente en voltios con relación al potencial del H_2. Por convenio, los potenciales de reducción se expresan para reacciones parciales que corresponden a *reducciones* de este tipo, forma oxidada $+e^- \rightarrow$ forma reducida. Si en la reacción están implicados protones, como ocurre a menudo, entonces el potencial de reducción está en parte influenciado por la concentración de iones de hidrógeno (pH). Por convenio en biología, los potenciales de reducción se dan en condiciones de neutralidad (pH 7), ya que el citoplasma de las células es neutro o está próximo a la neutralidad. Utilizando estas convenciones, el potencial de reducción (E_0') a pH 7 de

$$\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$$

es +0,816 voltios (V), y el de

$$2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$$

es −0,421 V.

Pares de oxidación-reducción y reacciones completas redox

La mayoría de las moléculas pueden ser o bien donadoras de electrones o bien aceptoras, dependiendo de qué sustancias reaccionen con ellas. El mismo átomo a cada lado de la flecha en las ecuaciones químicas puede considerarse como un *par redox*, por ejemplo, $2H^+/H_2$ o $\frac{1}{2}O_2/H_2O$. Cuando se escribe un par redox, la forma *oxidada* se sitúa siempre a la izquierda.

Para formar reacciones completas de oxidación-reducción a partir de las correspondientes semirreacciones, lo más simple es recordar que la sustancia reducida de un par redox cuyo potencial de reducción es más negativo, *cede* electrones a la sustancia oxidada de una pareja cuyo potencial sea más positivo. Por ejemplo, en el par $2H^+/H_2$, que tiene un potencial de −0,42 V, el H_2 tiene una gran tendencia a donar electrones. Por otro lado, en el par $\frac{1}{2}O_2/H_2O$, que tiene un potencial de +0,82 V, el H_2O tiene muy poca tendencia a ceder electrones, pero el O_2 tiene una gran tendencia a *aceptarlos*. En consecuencia, en una reacción en la que intervengan H_2 y O_2, el H_2 será el donador de electrones y se oxidará; y el O_2 será el aceptor de electrones y se reducirá (Figura 5.8). Incluso, aunque las reacciones parciales se escriben como reducciones por convenciones químicas, en una reacción redox real una de las dos semirreacciones debería escribirse como una oxidación y, por consiguiente, proceder en sentido inverso. Así, en la reacción indicada en la Figura 5.8, la oxidación del H_2 a $2H^+ + 2e^-$ está escrita al revés de una semirreacción formal, representada como una reducción.

La torre de electrones

Un modo conveniente de visualizar la transferencia de electrones en los sistemas biológicos es imaginar una torre vertical (Figura 5.9). La torre representa el rango de potenciales para los diversos pares redox con los más negativos arriba y los más positivos abajo. La sustancia reducida del par redox situado en la parte superior de la torre es la que tiene mayor tendencia a donar electrones, mientras que la sustancia oxidada del par más inferior en la torre tiene mayor tendencia a aceptar electrones.

Cuando los electrones de un donador de electrones situado en la parte superior de la torre (o escala) son cedidos, pueden ser «captados» por aceptores de distintos niveles.

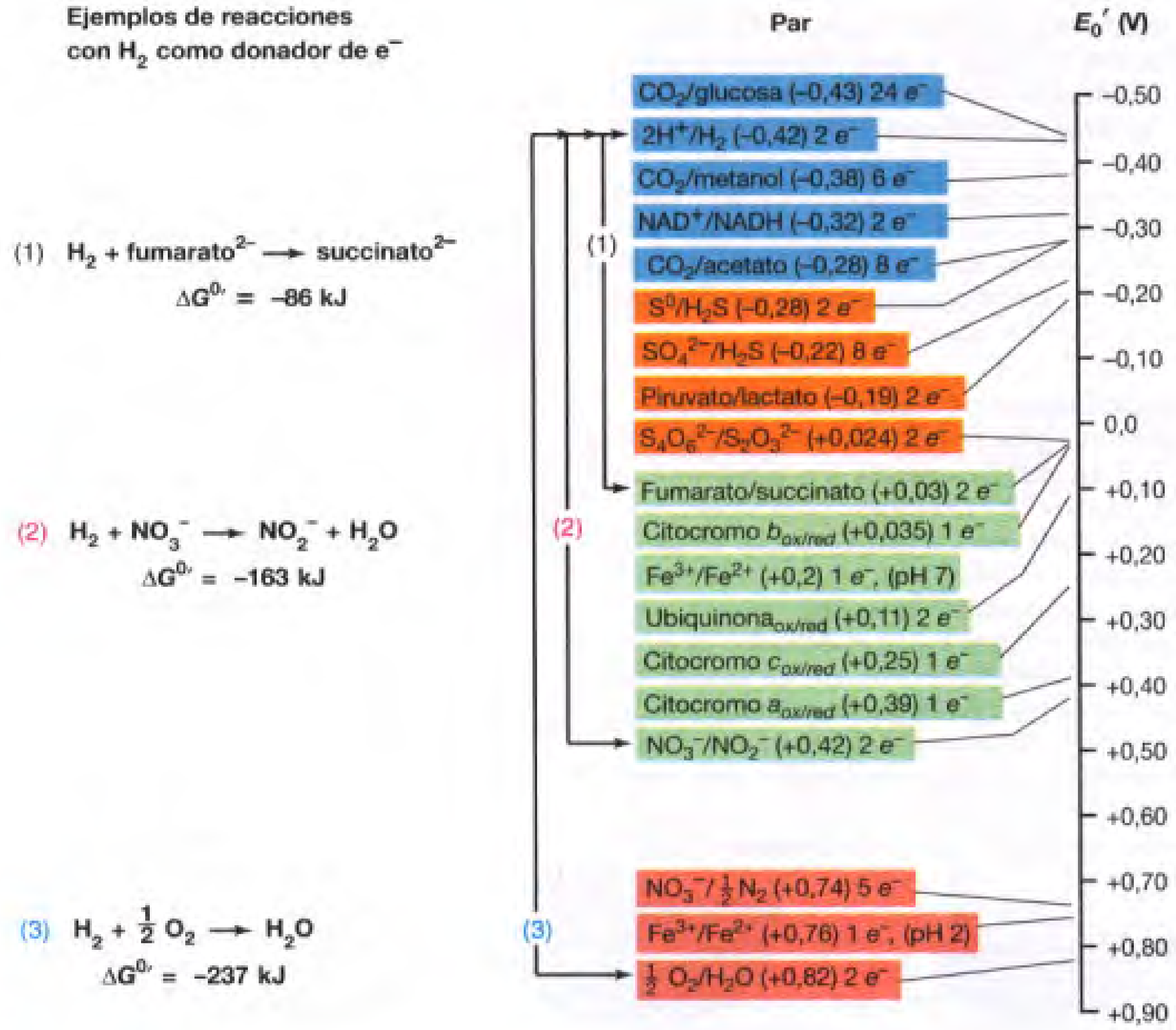

Ejemplos de reacciones con H_2 como donador de e^-
Par
E_0' (V)
(1) H_2 + fumarato^{2-} → succinato^{2-}
$\Delta G^{0\prime}$ = −86 kJ
(2) $H_2 + NO_3^- \rightarrow NO_2^- + H_2O$
$\Delta G^{0\prime}$ = −163 kJ
(3) $H_2 + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O$
$\Delta G^{0\prime}$ = −237 kJ
(1)
(2)
(3)
CO_2/glucosa (−0,43) 24 e^-
$2H^+/H_2$ (−0,42) 2 e^-
CO_2/metanol (−0,38) 6 e^-
NAD^+/NADH (−0,32) 2 e^-
CO_2/acetato (−0,28) 8 e^-
S^0/H_2S (−0,28) 2 e^-
SO_4^{2-}/H_2S (−0,22) 8 e^-
Piruvato/lactato (−0,19) 2 e^-
$S_4O_6^{2-}/S_2O_3^{2-}$ (+0,024) 2 e^-
Fumarato/succinato (+0,03) 2 e^-
Citocromo $b_{ox/red}$ (+0,035) 1 e^-
Fe^{3+}/Fe^{2+} (+0,2) 1 e^-, (pH 7)
Ubiquinona$_{ox/red}$ (+0,11) 2 e^-
Citocromo $c_{ox/red}$ (+0,25) 1 e^-
Citocromo $a_{ox/red}$ (+0,39) 1 e^-
NO_3^-/NO_2^- (+0,42) 2 e^-
$NO_3^-/\frac{1}{2}N_2$ (+0,74) 5 e^-
Fe^{3+}/Fe^{2+} (+0,76) 1 e^-, (pH 2)
$\frac{1}{2}O_2/H_2O$ (+0,82) 2 e^-
−0,50
−0,40
−0,30
−0,20
−0,10
0,0
+0,10
+0,20
+0,30
+0,40
+0,50
+0,60
+0,70
+0,80
+0,90

Figura 5.9 La torre de electrones. Los pares redox se ordenan desde los reductores más fuertes (potenciales de reducción negativos), en el extremo superior, hasta los oxidantes más fuertes (potenciales de reducción positivos), en el extremo inferior. Como los electrones son cedidos desde la parte superior a la inferior, pueden ser «captados» por aceptores a diversos niveles. Cuanto mayor sea la caída antes de ser captados (diferencia de potenciales), más energía se liberará. A modo de ejemplo, se muestra a la izquierda la diferente energía liberada cuando un mismo donador de electrones, el H_2, reacciona con tres aceptores de electrones diferentes: fumarato, nitrato y oxígeno.

La diferencia de potencial entre dos sustancias se expresa como $\Delta E_0'$. Cuanto más lejos caigan en esta torre (escala) los electrones desde el donador, antes de alcanzar al aceptor, mayor será la energía liberada; en otras palabras, $\Delta E_0'$ es *proporcional* a ΔG^0 (Figura 5.9). El O_2, en la parte inferior de la torre, es el aceptor de electrones más favorable de los usados por los microorganismos. Hacia la mitad de la torre, los pares redox pueden actuar como donadores o como aceptores de electrones. Como ejemplo, el par $2H^+ / H_2$ tiene un potencial de reducción de −0,42 V y el par fumarato/succinato un potencial de +0,02 V. Por tanto, la oxidación del hidrógeno (el donador de electrones) puede acoplarse a la reducción del fumarato (el aceptor de electrones):

$$H_2 + \text{fumarato}^{2-} \rightarrow \text{succinato}^{2-}$$

Pero, por otra parte, la oxidación del succinato a fumarato puede acoplarse a la reducción de NO_3^- o de $\frac{1}{2}O_2$

$$\text{Succinato}^{2-} + NO_3^- \rightarrow \text{fumarato}^{2-} + NO_2^- + H_2O$$
$$\text{Succinato}^{2-} + \tfrac{1}{2}O_2 \rightarrow \text{fumarato}^{2-} + H_2O$$

Por lo tanto, en condiciones de ausencia de oxígeno (condiciones *anóxicas*) y cuando el H_2 esté presente, el fumarato puede actuar como aceptor de electrones (produciendo succinato); y en otras condiciones (como por ejemplo, condiciones anóxicas en presencia de NO_3^-, o aeróbicas) el succinato puede ser un donador de electrones (produciendo fumarato). De hecho, todas las transformaciones descritas aquí que involucran al fumarato y al succinato son llevadas a cabo por varios microorganismos bajo diversas condiciones nutricionales y ambientales.

Donador de electrones ⇌ fuente de energía

En el catabolismo, a menudo se considera al donador de electrones como **una fuente de energía**. En la naturaleza existen muchos donadores de electrones potenciales (*véanse* Capítulos 17 y 19), pero por ahora es esencial tener en cuenta que lo que realmente libera energía no es el donador de electrones mismo, que contiene la energía, sino la reacción química mediante la cual se oxida el donador de electrones. Como se ha expuesto en el contexto de la torre de electrones, la cantidad de energía liberada en una reacción redox depende de la naturaleza *tanto* del donador *como* del aceptor de electrones: cuanto mayor sea la diferencia entre los respectivos potenciales de reducción, mayor será la energía liberada cuando reaccionen entre ellos (Figura 5.9; *véase* también el Apéndice 1).

✓ 5.6 Revisión de conceptos

Las reacciones de oxidación-reducción, que son los procesos generadores de energía en las células, suponen la transferencia de electrones de una sustancia a otra. La tendencia de un compuesto a aceptar o liberar electrones se expresa en términos cuantitativos por su potencial de reducción.

- ✓ En la reacción entre H_2 y $\frac{1}{2}O_2$, ¿cuál es el *donador* y cuál es el *aceptor* de electrones?
- ✓ ¿Qué es E_0' del par $2H^+/H_2$?
- ✓ ¿Por qué el NO_3^- es mejor aceptor de electrones que el fumarato?

5.7 El NAD como un transportador redox de electrones

La transferencia de electrones en una reacción oxidación-reducción en la célula, desde un donador a un aceptor, normalmente requiere uno o más intermediarios que actúan como **transportadores**. Cuando se necesitan tales transportadores, se designa al donador inicial como **donador primario de electrones** y al aceptor final como **aceptor final de electrones**. El cambio neto de energía de la reacción completa viene determinado por la *diferencia* entre los potenciales de reducción del donador primario y del aceptor final.

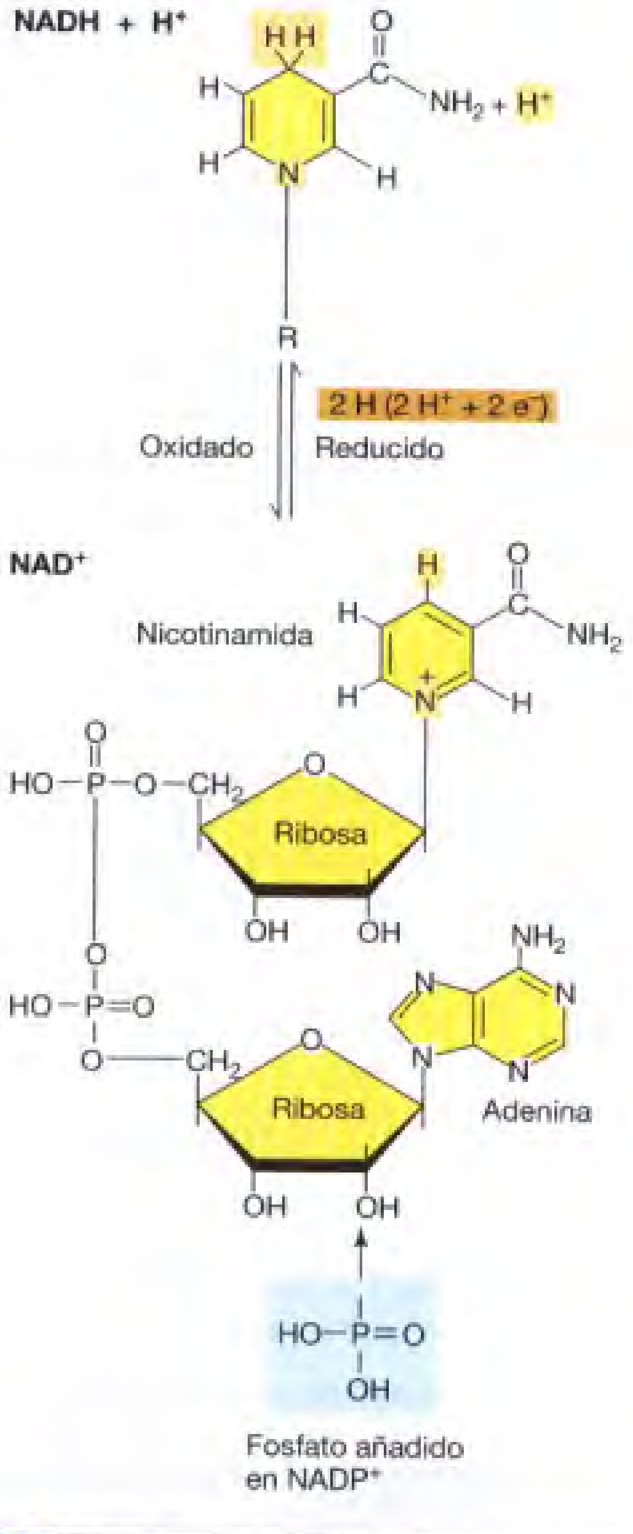


Figura 5.10 Estructura de la coenzima redox nicotinamida adenín dinucleótido (NAD⁺). En el NADP⁺ está presente un grupo fosfato, como se indica. Tanto NAD⁺ como NADP⁺ sufren oxidación-reducción tal como se señala, difunden libremente y son transportadores de átomos de hidrógeno.

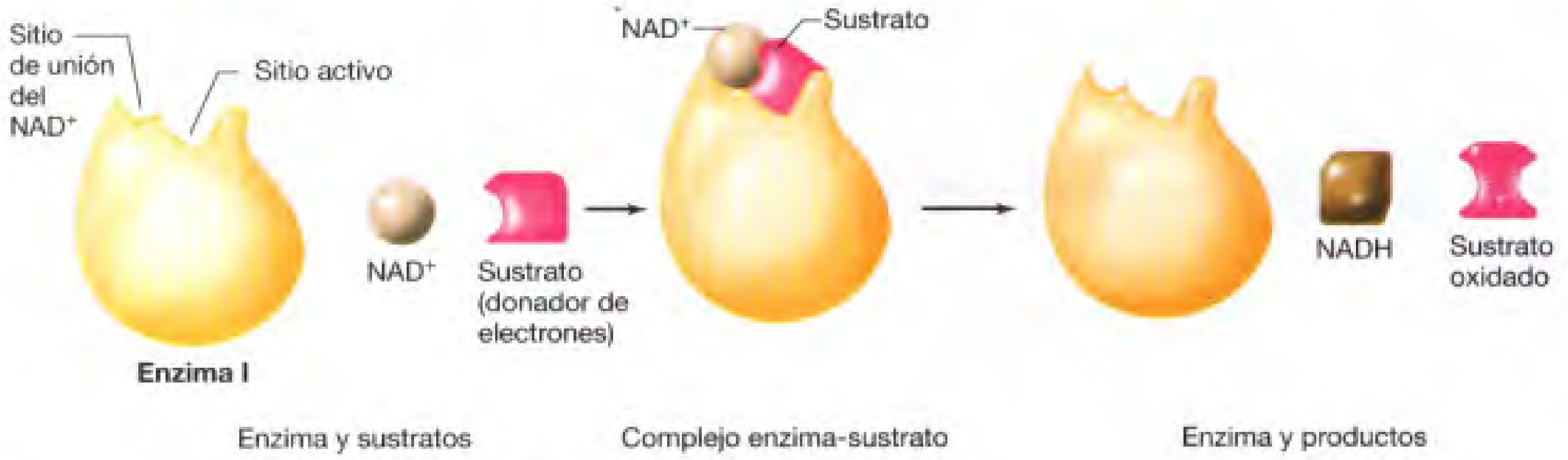
Existen dos tipos generales de transportadores de electrones: los que difunden libremente y los que están unidos firmemente a enzimas anclados en la membrana citoplasmática. Los transportadores fijados funcionan en las reacciones de transporte de electrones asociados a membranas y se expondrán en la Sección 5.11. Los transportadores difusibles incluyen las coenzimas nicotinamida adenín dinucleótido NAD^+) y NAD-fosfato ($NADP^+$) (Figura 5.10). NAD^+ y $NADP^+$ son transportadores de *átomos de hidrógeno* y transfieren dos átomos de hidrógeno al siguiente transportador de una cadena. Tal transferencia de átomos de hidrógeno se denomina deshidrogenación[†].

El potencial de reducción del par NAD^+/NADH (o del par $NADP^+$/NADPH) es –0,32 V, lo que lo sitúa bastante arriba en la torre de electrones; es decir, NADH (o NADPH) es un buen *donador* de electrones. No obstante, aunque los pares de NAD^+ y $NADP^+$ tienen los mismos potenciales de reducción, generalmente funcionan en la célula en operaciones distintas. NAD^+/NADH funciona en reacciones que generan energía (catabólicas), mientras que $NADP^+$/NADPH opera fundamentalmente en reacciones de biosíntesis (anabólicas).

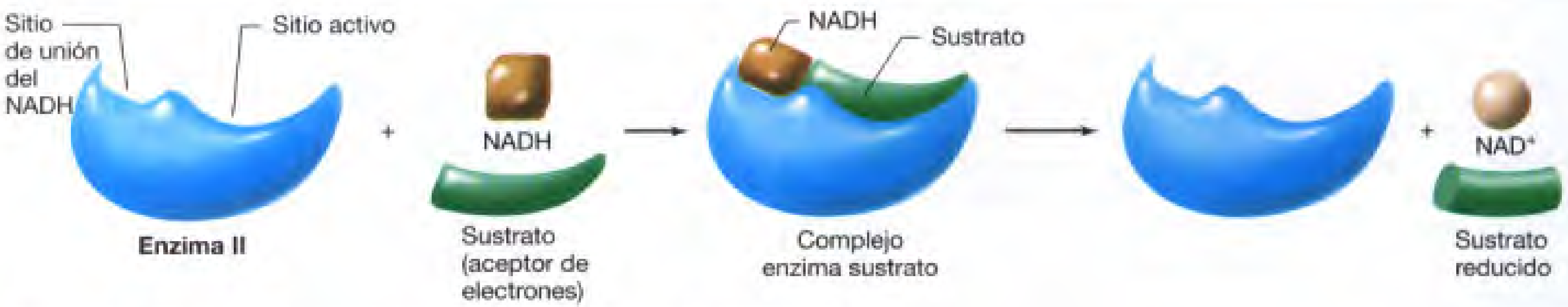
Reciclaje del NAD/NADH

Las coenzimas incrementan la diversidad de reacciones redox al hacer posible que dos compuestos químicos muy distintos puedan interaccionar, uno como donador primario y otro como aceptor final de electrones, actuando la coenzima como intermediaria. Como hemos expuesto, la mayoría de las reacciones biológicas son catalizadas por enzimas específicas que sólo pueden reaccionar con un conjunto bastante limitado de sustratos. Se puede considerar que las reacciones de oxidación-reducción ocurren en tres fases: extracción de los electrones del donador primario, transferencia de los electrones a través de una serie de transportadores, y captura de los electrones por el aceptor final. Cada paso está catalizado por una enzima distinta, que se une a su sustrato y a su coenzima específica. La Figura 5.11 muestra un diagrama esquemático sobre el funcionamiento de la coenzima NAD^+ en una reacción de dos partes. Nótese que después de que la coenzima ha realizado su función en una reacción, puede difundir por el citoplasma hasta que encuentra otra enzima que requiere esa coenzima en tal forma. El proceso completo puede repetirse tras la conversión de la coenzima a su estado original (Figura 5.11).

[†] En términos estrictos, el NAD^+ y $NADP^+$ transportan dos electrones y un protón, pues el segundo H^+ se libera a la solución. Por tanto, la reacción $NAD^+ + 2e^- + 2H^+$, en realidad, da lugar a $NADH + H^+$. Sin embargo, para simplificar, se escribe $NADH + H^+$ como NADH.



Reacción 1. La enzima I reacciona con el sustrato (donador de electrones) y con la forma oxidada de la coenzima NAD^+.



Reacción 2. La enzima II reacciona con el sustrato (aceptor de electrones) y la forma reducida de la coenzima NADH.

Figura 5.11 Esquema de una reacción oxidación-reducción que implica las formas oxidadas y reducidas de la coenzima nicotinamida adenín dinucleótido, NAD^+ y NADH.

✓ 5.7 Revisión de conceptos

A menudo, la transferencia de electrones desde un donador a un aceptor supone la participación de uno o varios transportadores de electrones. Algunos de estos transportadores están unidos a membranas mientras que otros, como el NAD$^+$/NADPH, difunden libremente, y transfieren electrones de una parte de la célula a otra.

- ✓ ¿Cuál es la diferencia entre un *electrón* y un átomo de *hidrógeno*?
- ✓ ¿Es mejor donador de electrones el NADH que el H_2? Razone la respuesta.

5.8 Compuestos de alta energía y almacenamiento de energía

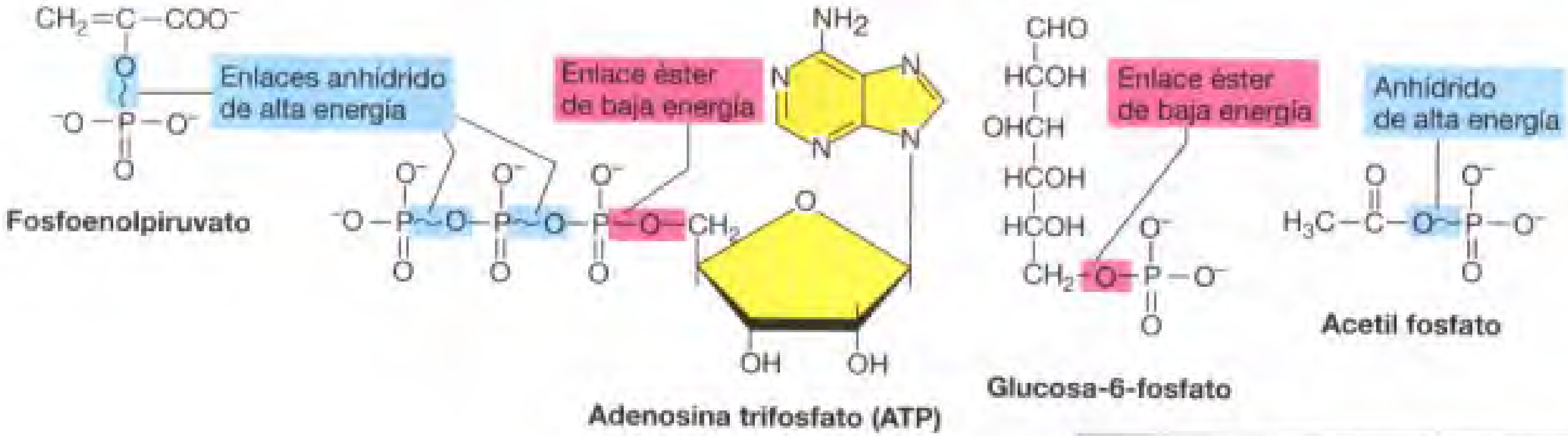
La energía liberada en las reacciones redox debe conservarse para el funcionamiento celular. En los organismos vivos, la energía química liberada en estas reacciones se conserva normalmente en forma de **enlaces fosfato de alta energía**. Estos compuestos son los que actúan luego como la fuente de energía que dirige las reacciones celulares que la requieren.

Los grupos fosfato en los compuestos fosforilados se unen a través de atómos de oxígeno mediante enlaces *éster* o *anhídrido*, como se indica en la Figura 5.12. Sin embargo, no todos los enlaces de fosfato son ricos en energía. Esta energía se expresa en términos de la energía liberada cuando el enlace fosfato es hidrolizado. Como se señala en la Figura 5.12, el valor ($G^{0\prime}$ en la hidrólisis del enlace fosfato de la glucosa-6-fosfato es de sólo 13,8 kJ/mol, mientras que el valor ($G^{0\prime}$ correspondiente a la hidrólisis del fosfato en el fosfoenol piruvato es de 51,6 kJ/mol, es decir, casi cuatro veces el de la glucosa-6-fosfato. Por tanto, el fosfoenol piruvato, que contiene un enlace fosfoanhídrido, se considera un *compuesto de alta energía*, mientras que la glucosa-6-fosfato, que contiene un enlace éster, no se considera como tal.

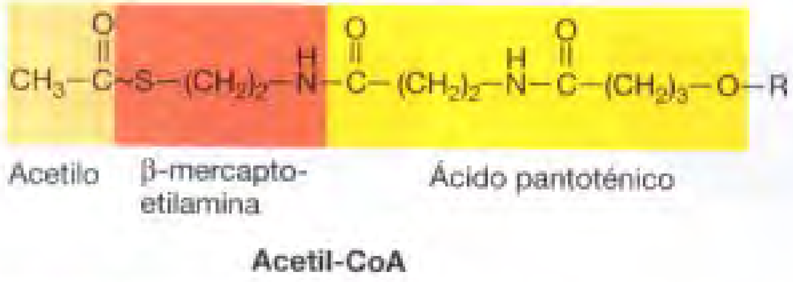
Adenosín trifosfato (ATP)

El compuesto más importante con fosfato de alta energía en los organismos vivos es el trifosfato de adenosina (ATP, adenosín trifosfato). El ATP consta del ribonucleósido de adenosina al que se unen en serie tres moléculas de fosfato (Figura 5.12). El ATP actúa como el transportador de energía principal en los organismos vivos y se genera en las reacciones exotérmicas para ser usado en las reacciones endotérmicas. De la estructura del ATP (Figura 5.12), se puede deducir que dos de los grupos fosfato del ATP presentan enlaces fosfoanhidrido y tienen altas energías libres de hidrólisis.

Debe considerarse que, aunque expresamos la energía de los enlaces fosfato de alta energía como energía libre de hidrólisis, en realidad no es deseable que tales enlaces resulten hidrolizados en la célula, en ausencia de una segunda reacción que pueda utilizar la energía liberada, porque entonces la energía libre de hidrólisis se perdería en forma de calor. La energía de estos enlaces se usa por lo general en



Enlaces anhídrido de alta energía
Fosfoenolpiruvato
Enlace éster de baja energía
Adenosina trifosfato (ATP)
Enlace éster de baja energía
Glucosa-6-fosfato
Anhídrido de alta energía
Acetil fosfato



Compuesto	$G^{0\prime}$ kJ/mol
Alta energía	
Fosfoenolpiruvato	−51,6
1,3-Difosfoglicerato	−52,0
Acetil fosfato	−44,8
ATP	−31,8
ADP	−31,8
Baja energía	
AMP	−14,2
Glucosa-6-fosfato	−13,8

Figura 5.12 Enlaces de alta energía. La tabla muestra la energía libre de hidrólisis de algunos ésteres o anhídridos de fosfato clave, indicando que algunos enlaces de tipo éster son más energéticos que otros. Se presenta la estructura de cuatro compuestos para indicar la posición de enlaces de alta y baja energía. El ATP contiene tres fosfatos, pero sólo dos de ellos (señalados en azul) son de alta energía. El ADP contiene dos fosfatos, de los cuales solamente uno es de alta energía. El AMP no contiene ningún enlace fosfato de alta energía. También se muestra la estructura de la coenzima acetil-CoA. El enlace C–S entre la porción acetil y la porción de β-mercaptoetilamina es un enlace tioéster de alta energía (*véase* Tabla 3.1). El grupo R del acetil-CoA es un grupo 3′ fosfo ADP.

reacciones biosintéticas y otros procesos celulares, mediante procesos cuidadosamente regulados en los que la energía liberada de la hidrólisis del ATP se acopla a reacciones que requieren energía.

Coenzima A

Además de compuestos de alta energía con *fosfato*, se producen en la célula otros compuestos que pueden conservar la energía que se libera en reacciones exotérmicas. Estos incluyen a derivados de la coenzima A (como el acetil-CoA, cuya estructura se presenta en la Figura 5.12). Los derivados de la coenzima A contienen enlace *tioéster* (sulfo*anhídrido*) en lugar de fosfo*anhídrido* (Figura 5.12) y suministran suficiente energía libre de hidrólisis como para dirigir la síntesis de un enlace fosfato de alta energía (*véase* Tabla 3.1). Por ejemplo, en la reacción: acetil-S-CoA + H_2O + ADP + P^- → acetato^- + HS-CoA + ATP + H^+, la energía que se libera en la hidrólisis de la coenzima A se conserva en la síntesis de ATP. Los derivados de la coenzima A (el acetil-CoA es tan sólo uno de ellos) son especialmente importantes en la producción de energía de los microorganismos anaerobios, particularmente en el caso de aquéllos cuyo metabolismo energético implica la fermentación (*véanse* Secciones 5.10, 17.19 y 17.20); volveremos a considerar estos importantes compuestos en el Capítulo 17.

Almacenamiento de la energía

La principal moneda energética de la célula, el ATP, está presente en concentraciones relativamente bajas, próximas a 2 milimolar (2 mM) en las células en crecimiento activo. El ATP está siendo degradado de modo contínuo permitiendo reacciones biosintéticas; y a la vez es resintetizado mediante reacciones catabólicas. Para el *almacenamiento* de la energía, las células producen polisacáridos insolubles que luego pueden oxidarse produciendo ATP. Como ejemplo se pueden citar los polímeros de poliglucosa, glucógeno y almidón (*véase* Figura 3.6), el polímero lipídico poli-β-hidroxibutirato y otros poli-hidroxialcanoatos (*véase* Figura 4.52), así como el azufre elemental, almacenado por muchos quimiolitrotofos del azufre. Estos polímeros se depositan dentro de la célula como grandes gránulos que a menudo se pueden observar por microscopía óptica o electrónica (*véase* Sección 4.13). En ausencia de una fuente de energía externa, las células pueden oxidar estos polímeros y ser capaces de hacer nuevo material celular o simplemente disponer del nivel de energía de mantenimiento, incluso cuando en el medio ambiente no se dispone de sustancias capaces de suministrar energía.

✓ 5.8 *Revisión de conceptos*

La energía liberada en reacciones de oxidación-reducción se conserva en la formación de algunos compuestos que contienen enlaces de alta energía con fosfato o azufre. El compuesto más frecuente con enlace fosfato de alta energía es el ATP, que es el transportador de energía más importante en la célula. El almacenamiento de la energía se relaciona con polímeros que pueden ser consumidos para suministrar ATP.

- ✓ ¿Por qué el ATP y el ADP se consideran compuestos con fosfato de alta energía y el AMP no?
- ✓ Señale cómo puede prepararse la célula para periodos de ayuno nutricional tras periodos de abundancia de nutrientes.

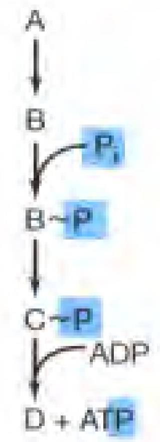
IV PRINCIPALES RUTAS CATABÓLICAS, TRANSPORTE DE ELECTRONES Y FUERZA MOTRIZ DE PROTONES

En las secciones siguientes (Figura 5.12) estudiaremos ejemplos bien conocidos y ampliamente distribuidos de reacciones catabólicas en microorganismos. Compararemos los procesos de fermentación y respiración, seguiremos con una visión detallada de cada uno de estos procesos y con una descripción de la fuerza motriz de protones. Esta última es la clave no sólo de la respiración clásica (es decir, la *aeróbica*) sino de muchos procesos metabólicos, como las reacciones que suministran energía en la respiración anaeróbica, la fotosíntesis y la quimiolitotrofía. La fuerza motriz de protones también sustenta otras funciones celulares, como muchas reacciones diferentes de transporte y de movimiento del flagelo y por deslizamiento (*véanse* Secciones 4.7 y 4.10-4.12).

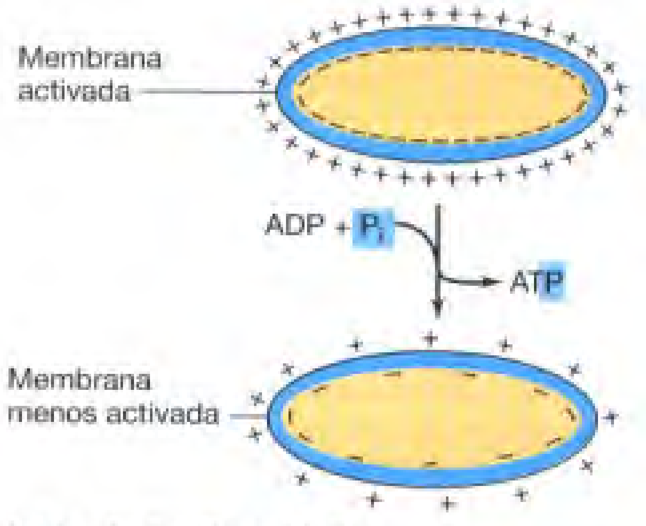
5.9 Conservación de la energía: opciones

En los quimiotrofos, es decir, en aquellos microorganismos que usan compuestos químicos como donadores de electrones en el metabolismo energético, se conocen dos mecanismos de conservación de energía: la **fermentación** y la **respiración**. En cada caso el resultado final es el mismo: la síntesis de ATP, una reacción endotérmica. Esta reacción, que necesita energía, se acopla con una u otra de las reacciones que liberan energía (exotérmicas) y que ocurren durante el catabolismo del donador de electrones. Desde el punto de vista de las reacciones redox, la fermentación y la respiración difieren en lo siguiente: (1) en la *fermentación* el proceso redox ocurre en *ausencia* de aceptores finales de electrones; mientras que (2) en la *respiración*, el oxígeno molecular o algún otro aceptor de electrones funciona como aceptor final de electrones. En la fermentación, la oxidación está acoplada a la reducción de un compuesto que se genera a partir del propio sustrato inicial; por tanto, no implica la intervención de ningún aceptor externo de electrones.

Además de esta diferencia, la fermentación y la respiración son procesos distintos en cuanto al mecanismo por el que se sintetiza ATP. En la fermentación, el ATP se produce mediante un proceso llamado **fosforilación a nivel de sustrato**, en el que el ATP se forma durante los pasos del catabolismo de un compuesto orgánico (Figura 5.13*a*). Ésta se diferencia de la **fosforilación oxidativa** (que se explicará más adelante), que produce ATP a expensas de la fuerza motriz de protones (Figura 5.13*b*). Una tercera forma de lo-



(a) **Fosforilación a nivel del sustrato**



(b) **Fosforilación oxidativa**

Figura 5.13 Conservación de la energía en la fermentación y en la respiración. (a) En la fermentación la síntesis de ATP tiene lugar como resultado de una *fosforilación a nivel de sustrato;* un grupo fosfato se añade a algún intermediario en la ruta bioquímica como un fosfato de alta energía y eventualmente se transfiere al ADP para formar ATP. (b) En la respiración, la membrana citoplasmática está energéticamente activada por la fuerza motriz de protones y pierde parte de esa energía en la formación de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (P_i), en el proceso llamado *fosforilación oxidativa.* El acoplamiento de la fuerza motriz de protones con la síntesis de ATP tiene lugar por medio de un complejo enzimático de membrana llamado ATP sintetasa (ATPasa) (*veáse* Sección 5.12 y Figura 5.21).

grar la síntesis del ATP es mediante **fotofosforilación**, que ocurre en organismos fotosintéticos, pero cuyo mecanismo básico es similar a la fosforilación oxidativa excepto que es la luz, en lugar de un compuesto químico, la que inicia las reacciones de oxidación-reducción (*véase* Sección 17.2).

✓ 5.8 Revisión de conceptos

La fermentación y la respiración son dos medios por los que los quimioorganotrofos conservan la energía de la oxidación de los compuestos orgánicos. Durante estas reacciones catabólicas se produce síntesis de ATP mediante fosforilación a nivel de sustrato (fermentación) o fosforilación oxidativa (respiración).

- ✓ ¿Qué forma de síntesis de ATP emplea la membrana citoplasmática?
- ✓ ¿En qué se diferencia la fosforilación a nivel de sustrato de la fosforilación oxidativa?

5.10 La glucolisis como ejemplo de fermentación

Una fermentación es una reacción de oxidación-reducción interna equilibrada en la que algunos átomos de la fuente de energía (donador de electrones) se reducen mientras otros se oxidan, y la energía se produce por fosforilación a nivel de sustrato. Una ruta bioquímica muy usada para la fermentación de la glucosa es la **glucolisis**, también denominada vía de **Embden-Meyerhof** en atención a sus descubridores. Se conocen otros tipos de fermentación, algunos de los cuales se presentan en el Capítulo 17.

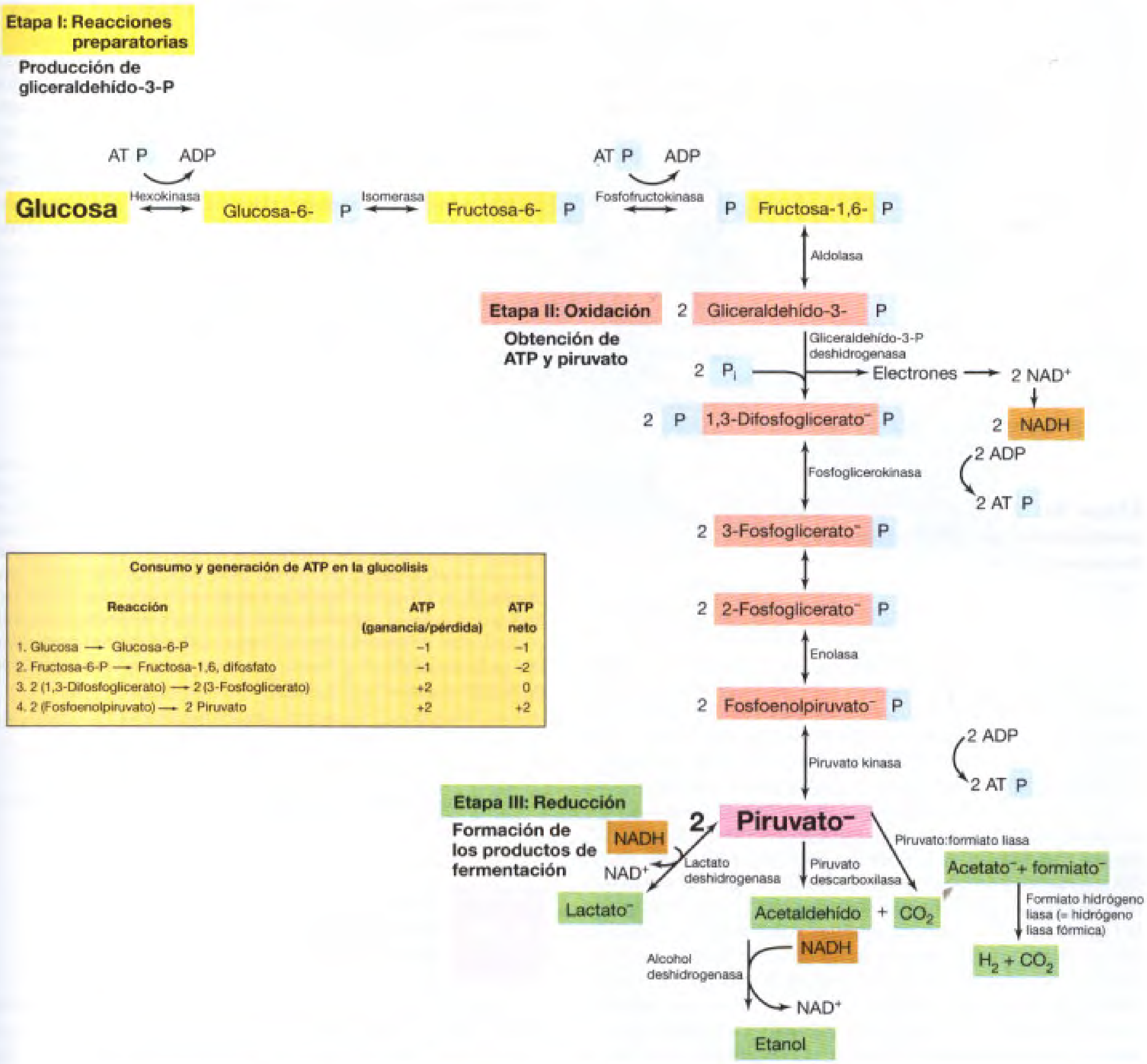
La glucolisis se puede dividir en tres etapas principales, cada una de las cuales comprende una serie de reacciones individuales catalizadas enzimáticamente (Figura 5.14). La etapa I incluye una serie de reacciones preparatorias que no implican ni oxidación ni reducción y que no liberan energía, pero que conducen a la producción a partir de glucosa de dos moléculas del intermediario clave *gliceraldehído-3-fosfato*. En la etapa II ocurre un proceso redox, la energía se conserva en forma de ATP, y se forman dos moléculas de piruvato. En la etapa III tiene lugar una segunda reacción redox y se originan los *productos de fermentación* (por ejemplo, etanol y CO_2, o ácido láctico) (Figura 5.14).

Etapas I y II: reacciones preliminares y reacciones redox

En la etapa I, la glucosa es fosforilada por el ATP dando lugar a glucosa-6-fosfato, que es convertida a continuación a una forma isomérica, la fructosa-6-fosfato, que mediante una segunda fosforilación se convierte en *fructosa-1,6-difosfato*, que es un metabolito intermediario clave de la glucolisis. Si se fermentan otros azúcares distintos a la glucosa, se convierten antes a fructosa-1,6-difosfato para poder ser utilizados por la ruta de Embden-Meyerhof. La enzima aldolasa cataliza la rotura de la fructosa-1,6-difosfato en dos moléculas de tres átomos de carbono, el gliceraldehído-3-fosfato y su isómero dihidroxiacetonafosfato (*véase* Figura 5.6).[‡] Existe una enzima que cataliza la interconversión de dihidroxiacetona-fosfato a gliceraldehído-3-fosfato pero, para simplificar, se considera sólo este último ya que es el que será metabolizado. Nótese que hasta ahora no ha ocurrido ninguna reacción redox y que todas las reacciones, incluyendo las del consumo de ATP, tienen lugar sin transferencia de electrones.

La primera reacción redox de la glucolisis tiene lugar en la etapa II durante la conversión del gliceraldehído-3-fosfato a ácido 1,3-difosfoglicérico. En esta reacción (que ocurre dos veces, una por cada molécula de gliceraldehído-3-fosfato), una enzima cuyo coenzima es NAD^+ acepta dos átomos de hidrógeno y el NAD^+ se convierte en NADH; la enzima que cataliza esta transformación se llama **gliceral-**

[‡] Hay una enzima que cataliza la interconversión de la dihidroxiacetona-fosfato y del gliceraldehído-3-fosfato. Simplificando aquí consideramos sólo el gliceraldehído-3-fosfato ya que es el componente que se metaboliza posteriormente.


Etapa I: Reacciones preparatorias
Producción de gliceraldehído-3-P
ATP
ADP
Glucosa
Hexokinasa
Glucosa-6- P
Isomerasa
Fructosa-6- P
ATP
ADP
Fosfofructokinasa
P Fructosa-1,6- P
Aldolasa
Etapa II: Oxidación
Obtención de ATP y piruvato
2 Gliceraldehído-3- P
Gliceraldehído-3-P deshidrogenasa
2 Pi
Electrones
2 NAD+
2 NADH
2 P 1,3-Difosfoglicerato⁻ P
Fosfoglicerokinasa
2 ADP
2 ATP
2 3-Fosfoglicerato⁻ P
2 2-Fosfoglicerato⁻ P
Enolasa
2 Fosfoenolpiruvato⁻ P
Piruvato kinasa
2 ADP
2 ATP
Etapa III: Reducción
Formación de los productos de fermentación
2 Piruvato⁻
NADH
NAD+
Lactato deshidrogenasa
Lactato⁻
Piruvato descarboxilasa
Piruvato:formiato liasa
Acetato⁻ + formiato⁻
Formiato hidrógeno liasa (= hidrógeno liasa fórmica)
H2 + CO2
Acetaldehído + CO2
NADH
Alcohol deshidrogenasa
NAD+
Etanol

Consumo y generación de ATP en la glucolisis

Reacción	ATP (ganancia/pérdida)	ATP neto
1. Glucosa ⟶ Glucosa-6-P	−1	−1
2. Fructosa-6-P ⟶ Fructosa-1,6, difosfato	−1	−2
3. 2 (1,3-Difosfoglicerato) ⟶ 2 (3-Fosfoglicerato)	+2	0
4. 2 (Fosfoenolpiruvato) ⟶ 2 Piruvato	+2	+2

Balance energético de la glucolisis

Ejemplos de estequiometría global:	Organismos:
(1) Glucosa ⟶ 2 etanol + 2 CO_2	Levaduras
(2) Glucosa ⟶ 2 lactato⁻ + 2 H^+	Bacterias del ácido láctico
(3) Glucosa ⟶ 1 lactato⁻ + 1 acetato⁻ +1 formiato⁻ + 3 H^+	Bacterias entéricas
(4) Glucosa ⟶ 1 lactato⁻ + 1 acetato⁻ + H_2 + CO_2 + 2 H^+	Bacterias entéricas

Energía libre:

1. Etanol/CO_2: −238,8 kJ/mol de glucosa fermentada. Asumiendo un valor de −31,8 kJ/mol para el enlace fosfato de alta energía del ATP, se conservan en ATP −63,6 kJ, lo que representa una eficiencia del 27%.
2. Lactato: −196 kJ, para una eficiencia del 32%.

Figura 5.14 Ruta de Embden-Meyerhof (glucolisis), la secuencia de reacciones enzimáticas que convierten glucosa en piruvato y luego en productos de fermentación (las enzimas se indican en letra pequeña). El producto de la aldolasa es realmente gliceraldehído-3-P y dihidroxiacetona-P, pero esta última se convierte en gliceraldehído-3-P. Nótese que el piruvato es el centro de la glucolisis y que todos los productos de la fermentación se hacen a partir del piruvato; sólo se indican unos cuantos ejemplos comunes.

dehído-3-fosfato deshidrogenasa. Simultáneamente, cada molécula de gliceraldehído-3-fosfato es fosforilada por la adición de una molécula de fosfato inorgánico. Esta reacción, en la que el fosfato inorgánico se convierte en orgánico, prepara el escenario para la conservación de la energía por fosforilación a nivel de sustrato; la formación de ATP es posible porque cada uno de los fosfatos de la molécula de ácido 1,3-difosfoglicérico presenta un enlace de alta energía (*véase* Figura 5.12). La síntesis de ATP tiene lugar cuando cada molécula de ácido 1,3-difosfoglicérico se convierte en ácido 1,3-fosfoglicérico y cuando más tarde en la vía, cada molécula de fosfoenolpiruvato se convierte en piruvato (Figura 5.14).

En la glucolisis, se consumen *dos* moléculas de ATP en las dos fosforilaciones de la glucosa y se sintetizan *cuatro* moléculas de ATP (dos por cada molécula de ácido 1,3-difosfoglicérico convertida a piruvato). Por tanto, la *ganancia neta* del organismo es de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa fermentada.

Etapa III: producción de productos de fermentación

Durante la formación de dos moléculas de ácido 1,3-difosfoglicérico, se reducen dos moléculas de NAD^+ a NADH (*véase* Figura 5.14). Sin embargo, las células contienen sólo una pequeña cantidad de NAD^+, y si todo se convirtiera en NADH se detendría la oxidación de la glucosa. La oxidación continuada del gliceraldehído-3-fosfato sólo puede proseguir si está presente una molécula de NAD^+ para aceptar los electrones liberados. Este «bloqueo» se supera en la fermentación mediante la nueva oxidación de NADH a NAD^+, a través de reacciones que suponen la reducción del piruvato a una extensa variedad de productos de fermentación. En el caso de las levaduras, el piruvato se reduce a etanol y se libera CO_2. En las bacterias del ácido láctico, el piruvato se reduce a lactato (*véase* parte inferior de la Figura 5.14). Se conocen muchas rutas para la oxidación del piruvato en procariotas fermentativos (*véanse* Capítulos 12 y 17) pero el resultado final es el mismo; el NADH debe volver a la forma oxidada NAD^+, a fin de que las reacciones que liberan energía en la fermentación puedan continuar. Como coenzima difusible, el NADH puede soltarse de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y unirse a una enzima que reduzca el piruvato a ácido láctico (lactato deshidrogenasa) y difundir de nuevo, haciendo que el ciclo de reconversión del NADH a NAD^+ y de NAD^+ a NADH se repita otra vez (*véase* la Figura 5.11 para detalles de este mecanismo).

En cualquier proceso que produzca energía, la oxidación debe acompañarse de una reducción y debe haber un aceptor de electrones por cada electrón cedido. En este caso, la *reducción* del NAD^+ en un paso enzimático de la glucolisis se equilibra con su *oxidación* en otro paso. Los productos finales deben estar también en equilibrio redox con el sustrato inicial, la glucosa. De aquí que los productos que aquí se generan, etanol más CO_2 o lactato más protones, estén en equilibrio atómico y electrónico con la glucosa inicial.

Fermentación de la glucosa: resultados netos y aplicación práctica

El resultado final de la glucolisis es el consumo de glucosa, la síntesis neta de dos ATPs y la formación de productos de fermentación. Para el organismo, el producto importante es el ATP, que se usa en multitud de reacciones que requieren energía, y los otros productos de fermentación son meros productos de desecho. Sin embargo, estos últimos no son considerados como tales por los destiladores, cerveceros, productores de derivados lácteos o panaderos (*véase* el recuadro «Los productos de fermentación de levaduras»). Por todo ello, la fermentación no es sólo un proceso que produce energía, sino un medio de obtener productos naturales que son de utilidad para el consumo humano. En el Capítulo 30, expondremos la formación de productos industriales por fermentación con más detalle.

✓ 5.10 Revisión de conceptos

La glucolisis es la ruta de fermentación más importante y está ampliamente distribuida en los seres vivos. El resultado final de la glucolisis es la liberación de una pequeña cantidad de energía, que se conserva como ATP, para ser usada en varias funciones celulares y la formación de productos de fermentación derivados del piruvato, un intermediario clave. Los productos de la fermentación más frecuentes son etanol, ácido láctico, y una extensa variedad de otros ácidos y alcoholes, así como compuestos gaseosos, dependiendo del organismo particular. Por cada molécula de glucosa que se consume en la glucolisis se producen dos moléculas de ATP.

- ✓ ¿Qué reacciones de la glucolisis implican oxidaciones y reducciones?
- ✓ ¿Cuál es el papel del NAD^+ en la glucolisis?
- ✓ ¿Por qué se forman los productos de fermentación durante la glucolisis?

5.11 Respiración y transportadores de electrones asociados a membranas

Acabamos de analizar cómo tiene lugar la fermentación de la glucosa mediante la glucolisis, un proceso que ocurre en ausencia de aceptores de electrones exógenos. En la fermentación, se libera una pequeña cantidad de energía y sólo se sintetizan unas cuantas moléculas de ATP. Esta escasa liberación de energía puede comprenderse considerando los principios formales de las reacciones redox. Las fermentaciones proporcionan poca energía por dos razones: (1) los átomos de carbono del compuesto inicial están oxidados sólo parcialmente (*véase* Figura 5.14); y (2) la diferencia entre los potenciales de reducción del donador primario de electrones y del aceptor final de electrones es relativamente pequeña. Sin embargo, si el O_2 o algún otro aceptor final estuviera presente, todas las moléculas de sustrato podrían oxidarse hasta CO_2 y sería posible obtener, teóricamente, un rendimiento en ATP mucho mayor. El proceso por el que un compuesto se oxida usando O_2 como aceptor final de electrones se llama **respiración aeróbica**.

Técnicas y Aplicaciones...

Los productos de la fermentación de levaduras

Barton Spear

Figura 1 Productos importantes obtenidos por fermentación mediante la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Los procesos energéticos aeróbicos y anaeróbicos pueden parecer aburridos y prosaicos, pero constituyen la base de algunos de los descubrimientos más impactantes de la raza humana, los alimentos y las bebidas fermentadas (*veáse* foto).

En la producción del pan y la mayoría de las bebidas alcohólicas, se utiliza la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para producir etanol y CO_2. Encontrada en varios materiales ricos en azúcar como zumos de fruta y néctar, las levaduras pueden llevar a cabo los dos tipos opuestos de metabolismo quimioorganotrófico que se han expuesto en este capítulo: la fermentación y la respiración. Cuando el oxígeno está presente, las levaduras crecen eficazmente sobre el azúcar formando biomasa y CO_2 (derivado del ciclo del ácido cítrico). Sin embargo, en ausencia de oxígeno las levaduras cambian a un metabolismo anaeróbico que origina menor cantidad de biomasa celular pero cantidades notables de alcohol y CO_2.

Cada productor de vino o de cerveza es un microbiólogo aficionado, incluso sin saberlo (*véase* Cerveza casera, Capítulo 30). Cuando se prensan las uvas para obtener el mosto, un pequeño número de células de levaduras presentes en las uvas, ya desde las viñas, se transfieren al mosto. Durante los primeros días del proceso de elaboración del vino, las levaduras crecen por respiración consumiendo oxígeno, por lo que el mosto se vuelve anóxico. Tan pronto como se acaba el oxígeno comienza la fermentación y con ello el proceso de formación de alcohol a partir de la glucosa. Este cambio del metabolismo aeróbico al anaeróbico es crítico y se debe tener especial cuidado en que el aire no penetre en los recipientes de fermentación.

El vino es sólo un producto de los muchos que forman las levaduras. Otros son la cerveza y las bebidas destiladas como brandy, whisky, wodka o ginebra (*veáse* foto). En las bebidas destiladas, el etanol producido en concentraciones relativamente bajas por la levadura (10–15% en volumen) se concentra por destilación hasta un 40–60%. Incluso se produce por levaduras alcohol como combustible para motores en partes del mundo donde hay mucho azúcar pero poco petróleo (como Brasil). Las levaduras también se usan como agentes fermentadores para levantar la masa en la elaboración del pan, aunque en este caso lo importante no es el alcohol sino el CO_2, el otro producto de la fermentación alcohólica. Estudiaremos las levaduras y sus productos con cierto detalle en el Capítulo 30.

Por tanto, podemos entender cómo las células de levaduras, forzadas a desarrollar un estilo de vida fermentativo debido a la ausencia del oxígeno que necesitan para respirar, han influido en la vida de los seres humanos. Además de ser «productos de desecho» de la ruta glucolítica, el etanol y el CO_2 son, respectivamente, los ingredientes clave en la fabricación de bebidas alcohólicas y en la industria de la panadería. ■

Nuestra exposición sobre la respiración aeróbica se centra en las transformaciones que afectan tanto al carbono como a los electrones: (1) las vías bioquímicas implicadas en la transformación del carbono orgánico a CO_2; y (2) el modo en que los electrones son transferidos desde el compuesto orgánico hasta el aceptor final de electrones, originando síntesis de ATP a expensas de la fuerza motriz de protones (Figura 5.13*b*). Comenzaremos con la exposición del flujo de electrones.

Sistemas transportadores de electrones

Los sistemas de transporte de electrones están *asociados a membranas*. Estos sistemas tienen dos funciones básicas: (1) aceptar electrones de un donador y transferirlos a un aceptor; y (2) conservar parte de la energía liberada durante el transporte de los electrones para la síntesis de ATP.

Existen varios tipos de enzimas de oxidación-reducción implicadas en el sistema de transporte de electrones: (1) NADH deshidrogenasas, que trasfieren átomos de hidrógeno desde el NADH; (2) transportadores que contienen riboflavina, generalmente llamados flavoproteínas [que contienen flavín mononucleótido (FMN) o flavín-adenina dinucleótido (FAD)]; (3) proteínas con hierro y azufre; y (4) citocromos, que son proteínas que contienen un anillo porfirínico llamado *hemo*. Además, se conocen transportadores no proteicos, como las *quinonas* solubles en lípidos que pueden difundir libremente por la membrana transfiriendo electrones, por lo general desde las proteínas con hierro y azufre a los citocromos. Estudiaremos cada uno de estos componentes del sistema de transporte de electrones con más detalle.

Las **NADH deshidrogenasas** son proteínas unidas a la cara interna de la membrana celular. Aceptan átomos de hidrógeno procedentes del NADH (Figura 5.10) que se genera en varias reacciones celulares y pasan los átomos de hidrógeno a las flavoproteínas.

Las **flavoproteínas** contienen un derivado de la riboflavina (Figura 5.15); la porción flavínica, que está unida a una proteína, actúa como grupo prostético que alternativamente se reduce cuando acepta átomos de hidrógeno y se oxida cuando cede electrones. Hay que destacar que las flavoproteínas *aceptan* átomos de hidrógeno y *ceden* electrones; más tarde consideraremos lo que sucede con los protones. En las células se encuentran normalmente dos tipos de flavinas, flavín mononucleótido y flavín-adenín dinucleótido, en el que el FMN se une a la ribosa y a la adenina mediante un segundo fosfato. La riboflavina, también denominada vitamina B_2, es un factor de crecimiento que necesitan algunos organismos (*véanse* Sección 5.2 y Tabla 5.3).

Los **citocromos** son proteínas que contienen como grupo prostético un anillo porfirínico que contiene hierro (grupo hemo) (Figura 5.16). Los citocromos sufren oxidaciones y reducciones mediante la pérdida o ganancia de electrones aislados por parte del átomo de hierro situado en el centro de la molécula:

$$\text{Citocromo} - \text{Fe}^{2+} \rightleftharpoons \text{citocromo} - \text{Fe}^{3+} + e^-$$

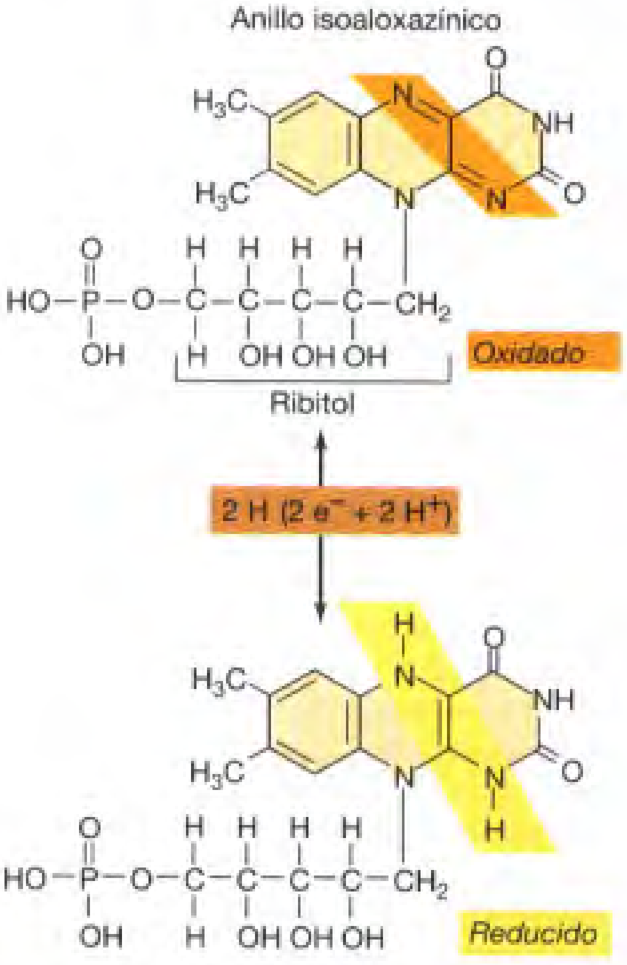


Figura 5.15 Flavín mononucleótido (FMN) (fosfato de riboflavina, un transportador de átomos de hidrógeno). El sitio de oxidación-reducción es el mismo en el FMN y en el flavín-adenina dinucleótido (FAD)

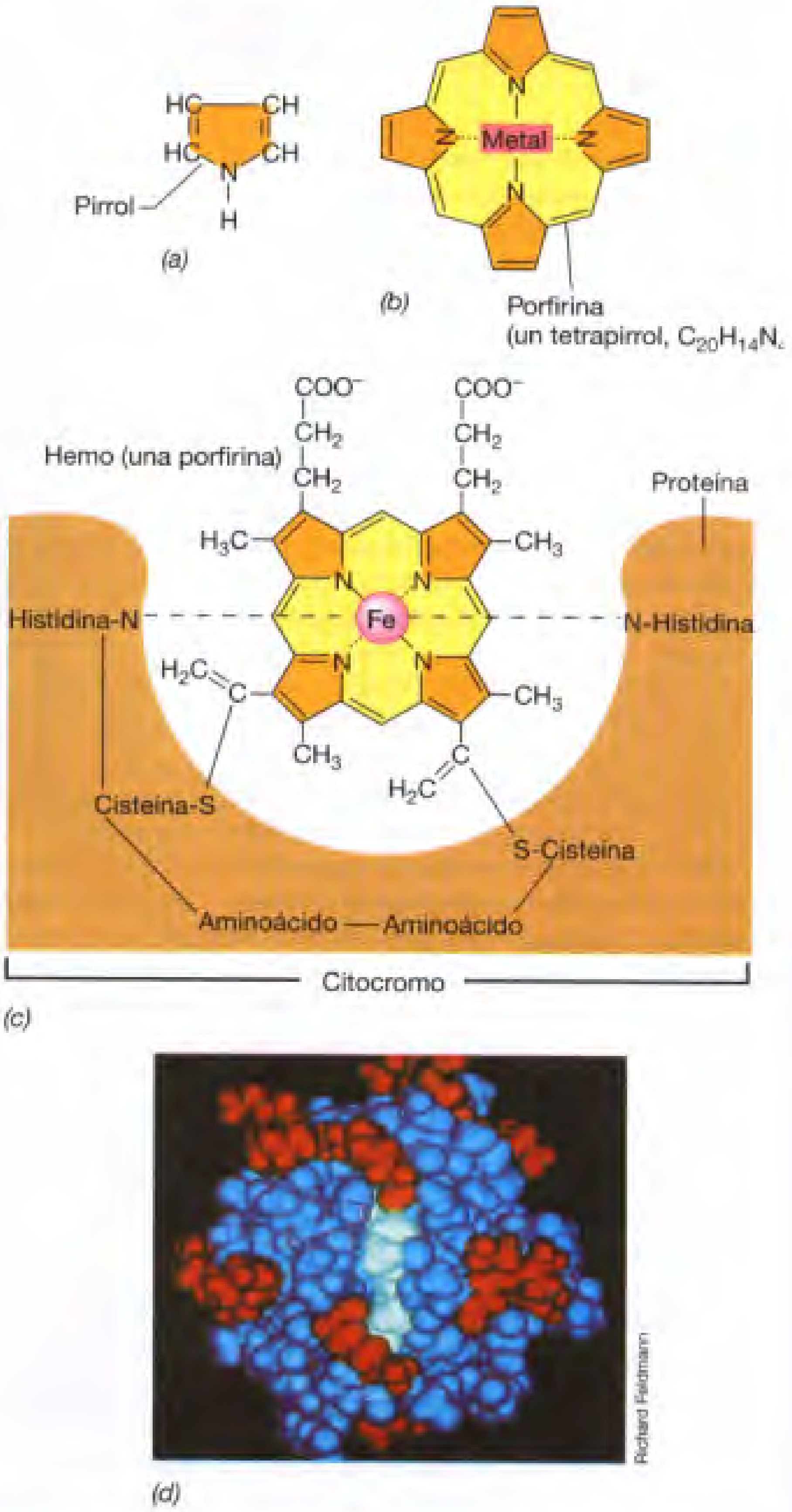


Figura 5.16 Citocromo y su estructura. (a) Estructura del anillo pirrólico. (b) Condensación de cuatro anillos pirrólicos para formar el anillo porfirínico. Se pueden incorporar varios metales en el anillo porfirínico. Por ejemplo, en los pigmentos de la clorofila, el metal es Mg^{2+} (*véanse* Sección 17.2 y Figura 17.3); en la vitamina B_{12}, es el Co^{2+} (*véanse* Sección 30.7 y Figura 17.42); y en algunas coenzimas porfirínicas especiales, el átomo metálico central puede ser el Ni^{2+} (*véanse* Sección 17.17 y Figura17.42). (c) En algunos citocromos, como en el citocromo *c*, el anillo porfirínico está covalentemente unido a la proteína mediante puentes disulfuro de moléculas de cisteína. Adviértase la presencia de hierro en el centro del anillo. (d) Modelo del citocromo *c* generado por computadora. La proteína rodea por completo el anillo de porfirina (color claro) situado en el centro. Los citocromos transportan sólo electrones, no átomos de hidrógeno; el sitio redox es el átomo de hierro que alterna entre los estados de oxidación Fe^{2+} y Fe^{3+}.

Existen varias clases de citocromos que se diferencian por sus potenciales de reducción. Un citocromo puede transferir electrones a un aceptor (citocromo, quinona, Fe/S) siempre que éste tenga un potencial de reducción más positivo; y pueda, a su vez, aceptar electrones de un donador que tenga un potencial de reducción menos negativo que él. Los distintos citocromos se designan por letras, como por ejemplo el citocromo *a*, citocromo *b*, citocromo *c*, dependiendo del tipo de hemo que contengan. Los citocromos de un organismo pueden variar ligeramente respecto a los de otro, de modo que existen designaciones del tipo citocromo a_1, citocromo a_2, citocromo aa_3, etc., entre citocromos de la misma clase. En ocasiones, los citocromos forman complejos muy fuertes con otros citocromos o con proteínas que contienen hierro y azufre. Un ejemplo es el complejo del citocromo bc_1, que contiene dos citocromos distintos de tipo *b* y un citocromo de tipo *c*, y que desempeña una función importante en el metabolismo energético (*véase* Sección 5.12 y Figura 5.20).

En las cadenas de transporte de electrones, además de los citocromos donde el hierro está unido al hemo, existen algunas proteínas que no contienen hemo pero que presentan hierro y azufre, normalmente abreviadas como **Fe/S proteínas**. Se han descrito varias disposiciones para el azufre y el hierro en diferentes proteínas con azufre y con hierro no hémico, pero las asociaciones de tipo Fe_2S_2 y Fe_4S_4 son las más comunes (Figura 5.17). Los átomos de hierro se unen al azufre libre y a la proteína mediante los átomos de azufre de unidades de cisteína (Figura 5.17). La *ferredoxina*, un ejemplo de estas proteínas en los sistemas biológicos, tiene una configuración Fe_2S_2. Los potenciales de reducción de las proteínas con hierro y azufre varían en un amplio margen dependiendo del número de átomos de hierro y azufre, y de cómo el hierro se una a la proteína. Por tanto, diferentes proteínas de este tipo pueden funcionar en diferentes puntos del proceso de transporte de electrones. Como los citocromos, las proteínas con hierro y azufre transportan *solamente electrones*, no átomos de hidrógeno.

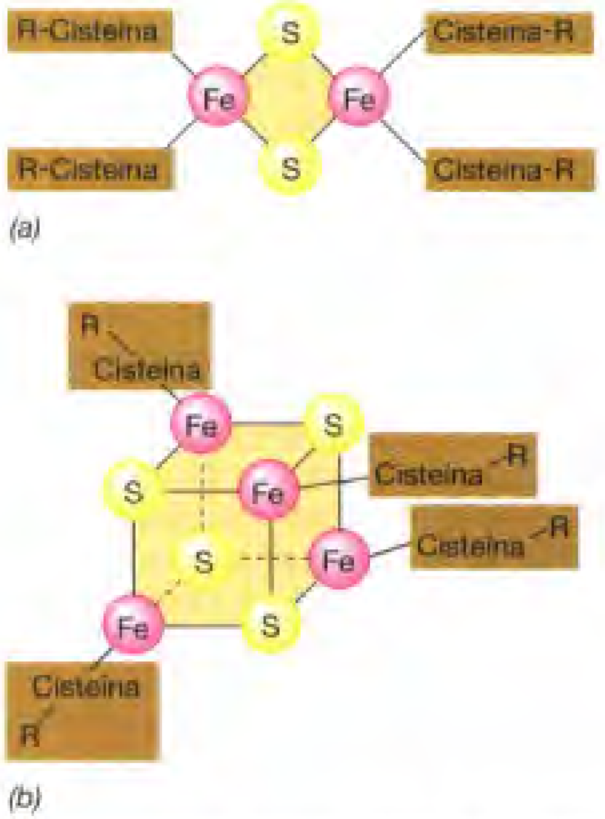


Figura 5.17 Disposición de los centros de hierro y azufre en las proteínas con hierro y azufre no hémicas. (a) Centro Fe_2S_2. (b) Centro Fe_4S_4. Los enlaces de cisteína proceden de la porción proteica de la molécula. Las proteínas con hierro y azufre sólo transportan electrones.

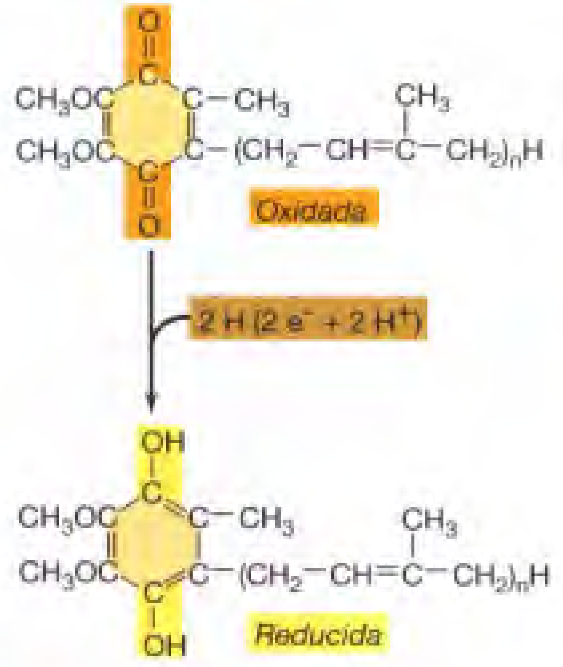


Figura 5.18 Estructura de las formas oxidadas y reducidas de la coenzima Q, una quinona. La unidad de cinco carbonos en la cadena lateral (un isoprenoide) ocurre en múltiplos; en bacterias, lo más común es $n = 6$ y en eucariotas es $n = 10$. Nótese que las quinonas oxidadas requieren dos átomos de hidrógeno (2 H) para reducirse por completo. Una forma intermediaria, la semiquinona (un H más reducido que la forma oxidada) se forma durante la reducción.

Las **quinonas** (Figura 5.18) son moléculas no proteicas altamente hidrofóbicas que participan en el transporte de electrones. Algunas quinonas bacterianas están relacionadas con la vitamina K, que es un factor de crecimiento en los animales. Como las flavoproteínas, las quinonas actúan como aceptores de *átomos de hidrógeno* y como donadores de *electrones*.

✓ 5.11 Revisión de conceptos

Los sistemas aeróbicos de transporte de electrones contienen una serie de transportadores asociados a membrana, y funcionan de modo cooperativo transportando electrones desde el donador de electrones hasta el oxígeno como aceptor final (terminal) de electrones.

- ✓ En comparación con la ferredoxina, ¿cómo está el hierro en un citocromo?
- ✓ ¿De qué modo importante se diferencia una quinona de otros transportadores de electrones en la membrana?
- ✓ ¿Qué transportadores aceptan sólo átomos de hidrógeno? ¿Qué transportadores aceptan sólo electrones?

5.12 Conservación de la energía a partir de la fuerza motriz de protones

Los principales componentes de las cadenas de transporte de electrones se señalan en la Figura 5.19. Durante el transporte de electrones se produce ATP por fosforilación oxi-

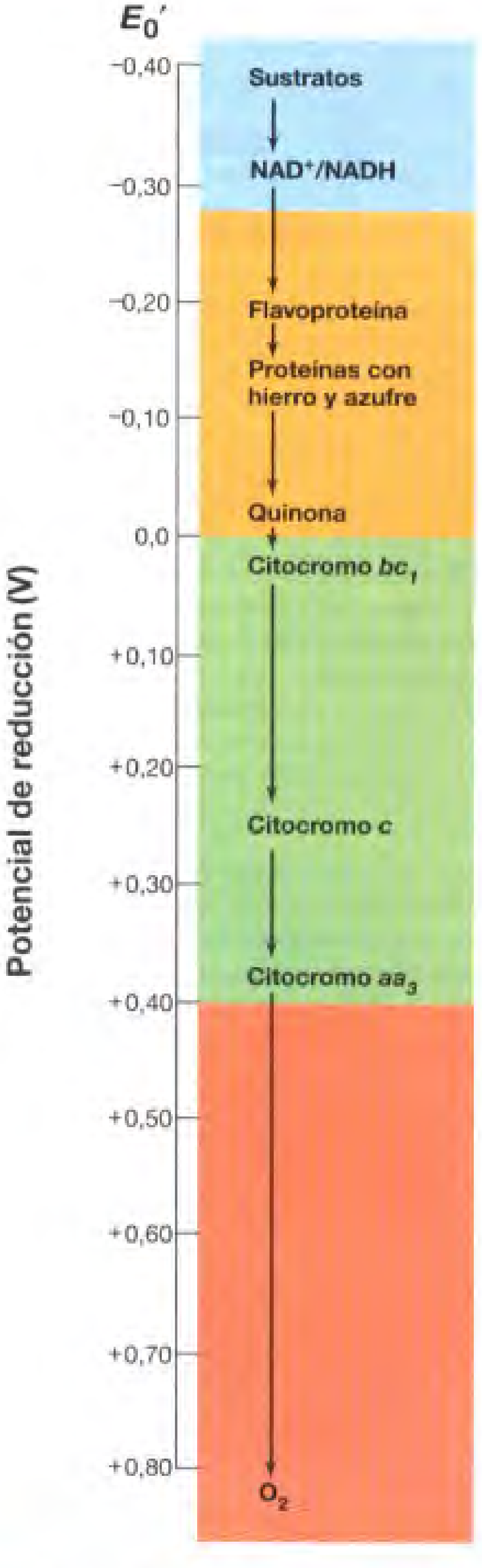


Figura 5.19 Ejemplo de un sistema transportador de electrones que media la transferencia de electrones desde el sustrato al O_2. Esta secuencia particular es típica de la cadena de transporte de electrones de las mitocondrias de las células eucarióticas y de *Bacteria* (por ejemplo, *Paracoccus denitrificans*). En *Escherichia coli*, la cadena transportadora de electrones carece de los citocromos *c* y aa_3, y los electrones van directamente del citocromo *b* al citocromo *o* ó *d*, que es la oxidasa terminal (*véase* Figura 17.37). Al dividir la oxidación completa en una serie de pasos concretos es posible la conservación de energía a través de la fuerza motriz de protones que conduce a la síntesis de ATP. Compárense los colores con los de la Figura 5.9.

dativa. La producción de ATP está directamente ligada al establecimiento de una **fuerza motriz de protones** a través de la membrana, de modo que las reacciones del transporte de electrones sirven para establecer este estado energético de la membrana. Consideraremos los detalles de este proceso.

La fuerza motriz de protones: quimioosmosis

Para entender el modo en que el transporte de electrones determina la síntesis de ATP debemos considerar antes la orientación del sistema de transporte de electrones en la membrana. La estructura general de la membrana se describió en la Sección 4.5 (*véase* Figura 4.17) y allí se destacó que las proteínas se presentan embebidas en la bicapa lipídica, y que su disposición es tal que muchas de ellas tienen acceso tanto a la cara externa como a la cara interna de la membrana (es decir, son proteínas transmembranales).

Los transportadores de electrones presentados anteriormente se orientan en la membrana de tal modo que durante el proceso del transporte tiene lugar una *separación* de protones y electrones a través de la membrana. Los átomos de hidrógeno, procedentes de los transportadores de átomos de hidrógeno como el NADH, se desdoblan en electrones y protones, y los primeros son transportados a través de la cadena por transportadores específicos mientras los protones son bombeados fuera de la célula al entorno (al periplasma en bacterias Gram negativas), por lo que se origina una ligera acidificación de la superficie externa de la membrana. Al final de la cadena de transporte, los electrones son recogidos por el aceptor final (el O_2 en el caso de la respiración aeróbica) que se reduce.

Cuando el O_2 se reduce a H_2O, necesita H^+ para completar la reacción y estos protones derivan de la disociación del agua en H^+ y OH^-. El empleo de H^+ en la reducción del O_2 a H_2O origina una acumulación neta de OH^- en la cara *interna* de la membrana. A pesar de su pequeño tamaño, como presentan carga, ni H^+ ni OH^- pueden atravesar libremente la membrana y, en consecuencia, no se puede restaurar espontáneamente el equilibrio. Por tanto, aunque se considera que el transporte de electrones hasta el O_2 produce agua, lo que realmente produce son los *componentes* del agua, H^+ y OH^-, que se acumulan en lados opuestos de la membrana. El resultado final en términos netos es la generación de un *gradiente de pH* o *potencial electroquímico* a través de la membrana, con la porción *interna* citoplásmica eléctricamente negativa y alcalina, y la porción *externa* de la membrana cargada positivamente y ácida. Este gradiente de pH y potencial electroquímico origina que la membrana posea un cierto estado energético (como una batería), y parte de esta energía eléctrica puede ser conservada por la célula.

El estado energético de una batería se expresa como su fuerza electromotriz (en voltios) y, de modo análogo, el estado energético de una membrana se expresa como la *fuerza motriz de protones* o fuerza protomotriz (también en voltios). Tal estado energético inducido como resultado de los procesos de transporte de electrones puede usarse directamente para producir trabajo útil, como el transporte de iones (*véase* Sección 4.7) o la rotación del flagelo (*véase* Sección 4.10), o bien puede utilizarse para dirigir la formación de enlaces fosfato de alta energía en ATP como describiremos más adelante. La idea de que un gradiente de protones conduce a la síntesis de ATP fue propuesta inicialmente en 1961 como la *teoría quimiosmótica* por el científico inglés Peter Mitchell, quien más tarde recibió el Premio Nobel por esta importante contribución.

Generación de la fuerza motriz de protones

Los pasos esenciales en la formación de la fuerza motriz de protones implican las actividades de las enzimas flavínicas, las quinonas y el complejo citocromo *bc₁* (Figura 5.20). La serie de reacciones de oxidación-reducción que tiene lugar durante el transporte de electrones puede analizarse examinando secuencialmente cada par de transportadores. Después de la cesión de dos átomos de hidrógeno del NADH al FAD, se liberan dos H^+ cuando el FADH cede dos electrones (solamente) a una proteína con hierro y azufre que forma parte del Complejo I, mostrado en la Figura 5.20. Cuando esta proteína con hierro no hémico reduce la coenzima Q, se toman dos protones de la disociación del agua en el citoplasma. La coenzima Q pasa un electrón cada vez al complejo del citocromo bc_1, que se señala como Complejo III en la Figura 5.20. El complejo del citocromo bc_1 está formado por diversas proteínas que contienen varios hemos o centros metálicos, con dos tipos de hemo *b* (b_L y b_H), un tipo de hemo *c* (c_1) y una proteína Fe/S (llamada la *proteína de Rieshe*). El complejo bc_1 está presente en la cadena de transporte de electrones de la mayor parte de los organismos capaces de respirar. También desempeña una función importante en el flujo de electrones fotosintéticos (*véanse* Secciones 17.4 y 17.5).

La principal función del complejo citocromo bc_1 es transferir electrones de las quinonas al citocromo *c*, de modo acoplado a la translocación de protones a través de la membrana originando la acumulación de OH^- en el citoplasma y de protones en la superficie externa de la membrana (Figura 5.20). Los electrones viajan del complejo bc_1 a un citocromo *c* externo que se encuentra en el periplasma unido a la cara externa de la membrana, y de aquí hasta el complejo citocromo aa_3 de elevado potencial (Complejo IV en la Figura 5.20). Este último constituye la *oxidasa terminal* del sistema y reduce el O_2 a H_2O en el paso final del transporte de electrones (Figura 5.20).

El esquema que se ilustra en la Figura 5.20 es solamente una de las muchas secuencias de transportadores que se conocen en distintos organismos. Sin embargo, algunas propiedades son características de *todas* las cadenas de transporte de electrones y pueden resumirse como sigue: (1) presencia de una serie de transportadores de electrones asociados a membrana y dispuestos en orden que sigue el incremento de valores positivos de E_0'; (2) una alternancia de transportadores de «sólo-electrones» y transportadores de «sólo-átomos de hidrógeno» en la cadena; y (3) la generación de una fuerza motriz de protones a consecuencia de la separación de carga a través de la membrana, ácida fuera y alcalina dentro. Como ahora veremos, es la fuerza motriz de protones la que realmente suministra ATP.

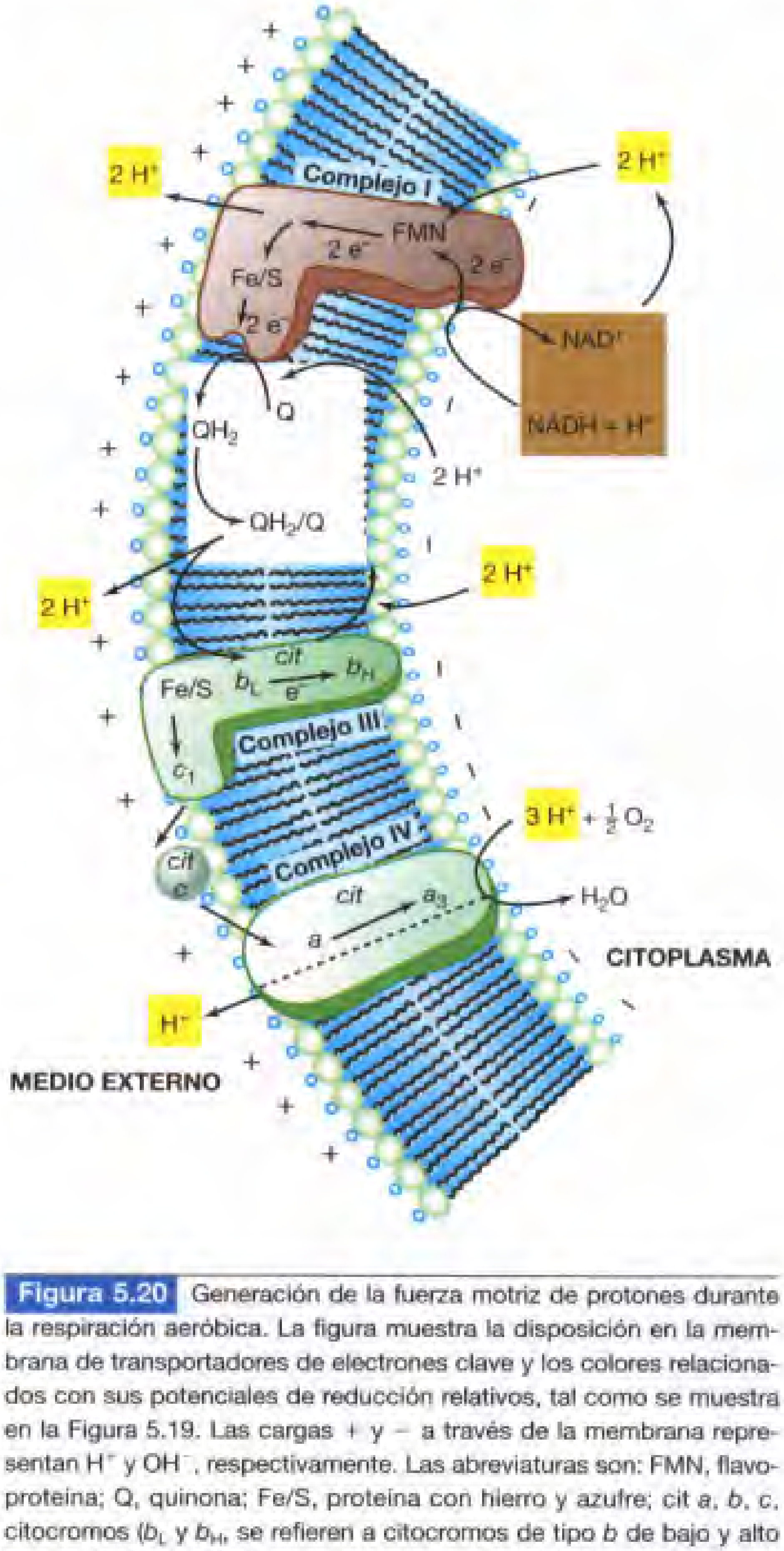


Figura 5.20 Generación de la fuerza motriz de protones durante la respiración aeróbica. La figura muestra la disposición en la membrana de transportadores de electrones clave y los colores relacionados con sus potenciales de reducción relativos, tal como se muestra en la Figura 5.19. Las cargas + y − a través de la membrana representan H^+ y OH^-, respectivamente. Las abreviaturas son: FMN, flavoproteína; Q, quinona; Fe/S, proteína con hierro y azufre; cit *a*, *b*, *c*, citocromos (b_L y b_H, se refieren a citocromos de tipo *b* de bajo y alto potencial). A nivel de la quinona ocurre un reciclaje de electrones debido al «ciclo Q». Ello se debe a que los electrones que proceden de QH_2 se pueden dividir en el complejo bc_1 (Complejo III) entre la Fe/S-proteína y los citocromos de tipo *b*. Los electrones que pasan a través de estos últimos reducen de nuevo Q a QH_2 (en dos pasos de transferencia de un electrón), incrementando así el número de protones bombeados en el sitio Q-bc_1. Los electrones que pasan a Fe/S continúan para reducir el citocromo c y luego los citocromos de tipo a en el Complejo IV, reduciendo eventualmente el O_2 a H_2O (se requieren dos átomos de hidrógeno para reducir $\frac{1}{2}O_2$ a H_2O). Para simplificar no se muestra en este esquema el complejo proteico II, el complejo succinato deshidrogenasa. Los números de los complejos son los utilizados convencionalmente por los especialistas en el campo de la bioenergética de membranas.

La fuerza motriz de protones y la formación de ATP

¿Cómo se usa esta fuerza para sintetizar ATP? Resulta interesante considerar que existe un fuerte paralelismo entre el mecanismo de síntesis de ATP y el mecanismo del motor que dirige la rotación del flagelo bacteriano (*véase* Sección 4.10). El catalizador de la conversión de la fuerza motriz de protones en ATP es un gran complejo enzimático situado en la membrana llamado **ATP sintetasa**, o abreviadamente **ATPasa.** La ATPasa contiene dos partes funcionales, una pieza globular llamada F_1, formada por varias subunidades y localizada en la cara citoplásmica de la membrana, y un canal conductor de protones llamado F_0, que atraviesa la membrana (Figura 5.21). El complejo F_1/F_0 cataliza una reacción *reversible* entre ATP y ADP + P_i (fosfato inorgánico) como se muestra en la Figura 5.21.

La ATPasa F_1/F_0 es el motor biológico más pequeño que se conoce. Considerando el modelo actual de cómo funciona la ATPasa de *Escherichia coli*, el movimiento de protones a través de la subunidad F_0 induce la rotación de las proteínas c generando una torsión que se transmite a F_1 mediante las subunidades $\gamma\epsilon$ (Figura 5.21). En esencia, la energía se transmite a F_1 a través de la rotación acoplada de las subunidades $\gamma\epsilon$ que causa cambios conformacionales en las subunidades β; esto constituye un trabajo realizado por el sistema (es decir, una energía potencial) que puede ser aprovechado para hacer ATP. Esto es posible debido a que los cambios conformacionales en las subunidades β permiten la unión entre ADP y P_i, que se convierten así en ATP cuando las subunidades β vuelven a su conformación original. En analogía con un motor flagelar (*véase* Figura 4.41), la función primordial de los componentes $b_2\delta$ de F_1 es servir como una fijación para evitar que las subunidades α y β giren a su vez con $\gamma\epsilon$, de modo que se evitarán los cambios conformacionales en β. A diferencia de lo que ocurre en el flagelo, la rotación en la ATPasa no se utiliza para el movimiento de la célula sino para sintetizar ATP (Figura 5.21). La síntesis de ATP por la ATPasa se denomina **fosforilación oxidativa** en los sistemas respiratorios y **fotofosforilación** en los organismos fototróficos. Las estimaciones estequiométricas en cuanto al número de protones consumidos por cada ATP producido en cualquiera de estos tipos de fosforilación indican valores de 3 a 4.

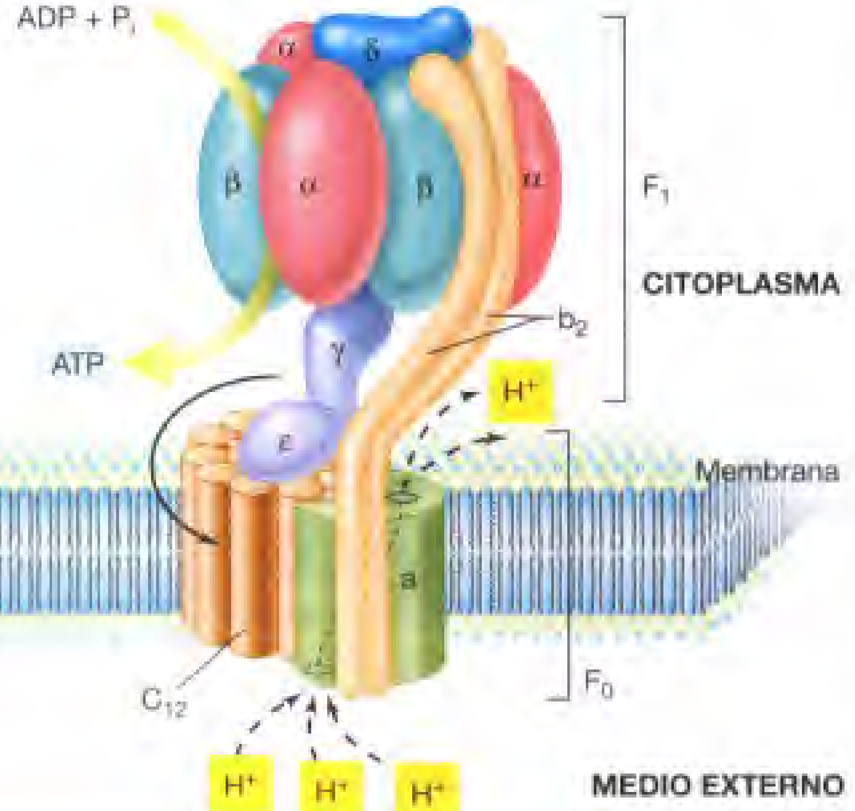


Figura 5.21 Estructura y función de la ATP sintetasa (ATPasa). F_1 consta de cinco polipéptidos diferentes que forman un complejo integrado por $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon\delta$. F_1 es el complejo catalítico responsable de la interconversión de ADP + P_i en ATP. F_0 está integrado en la membrana y comprende tres polipéptidos formando un complejo ab_2c_{12}. La subunidad a es la responsable de canalizar los protones a través de la membrana, mientras que la subunidad b sobresale fuera de la membrana y forma, junto con las subunidades b_2 y δ, la región fija de la enzima. Cuando los protones entran, la disminución de la fuerza motriz de protones se emplea en dirigir la síntesis de ATP. La acción de la ATPasa es reversible, pues la hidrólisis de ATP puede originar la formación de una fuerza motriz de protones.

El diminuto motor molecular F_1/F_0 puede trabajar en sentido inverso: la hidrólisis de ATP provoca una torsión para que $\gamma\epsilon$ gire en el sentido opuesto, lo que ocasiona que los protones sean bombeados desde el interior al exterior celular a través de una subunidad del estator creando así una fuerza motriz de protones en lugar de disiparla. Esta reversibilidad explica por qué los organismos fermentadores, que son incapaces de realizar la fosforilación oxidativa, conservan no obstante la actividad ATP sintetasa. Como muchas reacciones en la célula, como la movilidad y el transporte, requieren la energía de una fuerza motriz de protones; la ATPasa en organismos del tipo de las bacterias lácticas, que no respiran, funciona unidireccionalmente gastando ATP para generar una fuerza motriz de protones que hace posible estas funciones celulares.

Inhibidores y agentes desacoplantes

El proceso del transporte de electrones se puede estudiar con ayuda de algunos compuestos que afectan a la fosforilación oxidativa. A este respecto, se conocen dos tipos de compuestos: los *inhibidores* y los *desacopladores*. Los inhibidores bloquean el flujo de electrones y, por tanto, la generación de la fuerza motriz de protones. Ejemplos de este tipo son el monóxido de carbono (CO) y el cianuro (CN^-), que se unen fuertemente a algunos citocromos e inhiben su función. Por el contrario, los desacopladores evitan la síntesis de ATP *sin* afectar al transporte de electrones. Algunas sustancias liposolubles, como el dinitrofenol y el dicumarol, inducen poros en la membrana y destruyen, por tanto, la fuerza motriz de protones y su capacidad para producir la síntesis de ATP.

✓ 5.12 Revisión de conceptos

Cuando los electrones se transportan por un sistema de transporte de electrones integrado en la membrana, los protones se bombean hacia el exterior de la membrana formando la fuerza motriz de protones. Los principales transportadores de electrones son las flavinas, quinonas, el complejo del citocromo bc_1 y otros citocromos, dependiendo del organismo. La célula usa la fuerza motriz de protones a través de ATPasas giratorias que sintetizan ATP.

- ✓ ¿Cómo generan la fuerza motriz de protones las reacciones de transporte de electrones?
- ✓ ¿Qué estructura celular convierte la fuerza motriz de protones en ATP? ¿Cómo funciona?

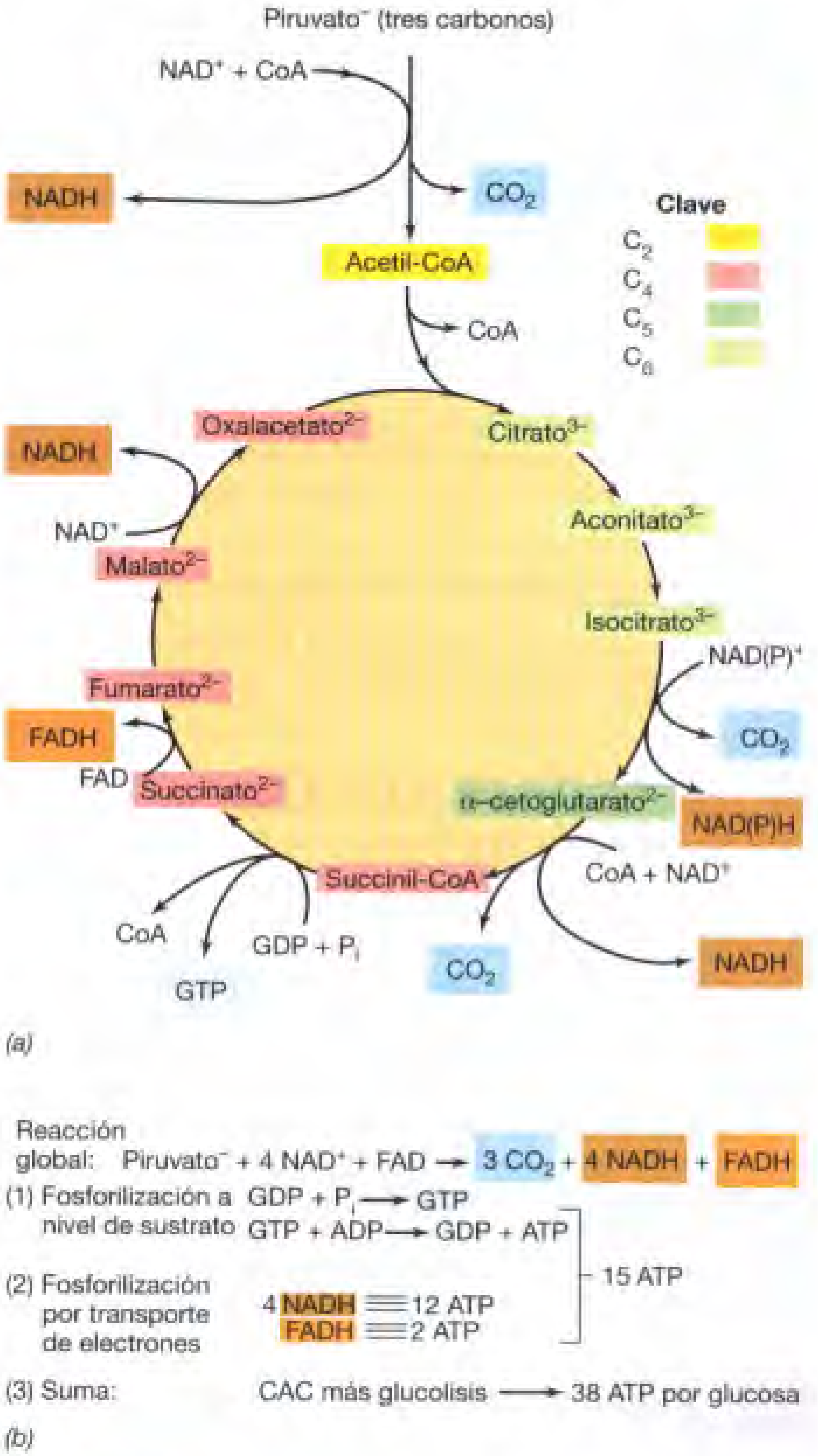
5.13 Flujo del carbono en la respiración: el ciclo del ácido cítrico

Consideremos ahora los aspectos metabólicos del flujo del carbono durante la respiración. Las etapas iniciales de la respiración de la glucosa incluyen los mismos pasos bioquímicos que en la glucolisis (*véase* Figura 5.14). Como se indicó, el piruvato es un intermediario clave en la glucolisis. Sin embargo, mientras que en la fermentación el piruvato se convierte en productos de la fermentación, durante la respiración el piruvato se oxida por completo a CO_2. Una ruta importante para la oxidación total del piruvato a CO_2 es el llamado **ciclo del ácido cítrico** (CAC) que se representa en la Figura 5.22.

El piruvato se decarboxila previamente originando la producción de una molécula de NADH y una molécula de acetilo acoplado a la coenzima A (acetil-CoA) (*véase* Figura 5.12). El grupo acetilo del acetil-CoA se combina con el compuesto de cuatro átomos de carbono oxalacetato formando ácido cítrico, un ácido orgánico que contiene seis átomos de carbono. Esta síntesis tiene lugar a expensas de la energía del enlace de alta energía del acetil-CoA (Figura 5.12). A continuación, se producen reacciones de hidratación, decarboxilación y oxidación, con la liberación de dos moléculas adicionales de CO_2. Finalmente, el oxalacetato se regenera y puede funcionar de nuevo como aceptor de grupos acetilo completando el ciclo.

Liberación de CO_2 y suministro al transporte de electrones

Por cada molécula de piruvato que se oxida en el ciclo se producen tres de CO_2, una durante la formación de acetil-CoA, otra por decarboxilación del isocitrato y otra por decarboxilación del α-cetoglutarato (Figura 5.22). Además, como en la fermentación, los electrones liberados durante la oxidación de intermediarios del CAC son transferidos a enzimas que contienen la coenzima NAD^+ o FAD. Sin embargo, la respiración difiere de la fermentación en la manera en la que el NADH y el FADH se oxidan. En la respiración, los electrones del NADH, en vez de usarse para reducir un intermediario como el piruvato, se transfieren al oxígeno o a otros aceptores finales de electrones mediante el *sistema de transporte de electrones* descrito en la Sección 5.12. Por tanto, a diferencia de lo que ocurre en la fermentación, la presencia en la respiración de un aceptor terminal de electrones permite la oxidación completa de la glucosa a CO_2 con mucha mayor producción de energía.



Piruvato⁻ (tres carbonos)
NAD⁺ + CoA
NADH
CO₂
Acetil-CoA
CoA
Clave
C₂ 🟨
C₄ 🟥
C₅ 🟩
C₆ 🟩
Oxalacetato²⁻
Citrato³⁻
NADH
NAD⁺
Malato²⁻
Aconitato³⁻
Isocitrato³⁻
NAD(P)⁺
Fumarato²⁻
FADH
FAD
Succinato²⁻
CO₂
α-cetoglutarato²⁻
NAD(P)H
Succinil-CoA
CoA + NAD⁺
CoA
GDP + Pᵢ
GTP
CO₂
NADH
(a)
Reacción global: Piruvato⁻ + 4 NAD⁺ + FAD → 3 CO₂ + 4 NADH + FADH
(1) Fosforilización a nivel de sustrato GDP + Pᵢ → GTP
GTP + ADP → GDP + ATP
(2) Fosforilización por transporte de electrones 4 NADH ≡ 12 ATP
FADH ≡ 2 ATP
15 ATP
(3) Suma: CAC más glucolisis → 38 ATP por glucosa
(b)

Figura 5.22 El ciclo del ácido cítrico (CAC). (a) El CAC comienza cuando el acetil-CoA, un compuesto de dos átomos de carbono que deriva del piruvato, se condensa con el oxalacetato, de cuatro átomos de carbono, para formar citrato. A través de una serie de transformaciones y oxidaciones, este compuesto de seis carbonos se convierte al final en el compuesto inicial de cuatro átomos de carbono, el oxalacetato, que comienza de nuevo el ciclo con la adición de otra molécula de acetil-CoA. (b) Balance global de CO_2 y de combustible (NADH/FADH) generado en el CAC para la cadena de transporte de electrones.

Biosíntesis y ciclo del ácido cítrico

Además de realizar una función importante en las reacciones catabólicas, el ciclo del ácido cítrico es importante también en reacciones biosintéticas de la célula. El ciclo se compone de una serie de intermediarios clave que pueden ser utilizados para fines biosintéticos cuando se requieren. En este contexto, son muy importantes los intermediarios α-cetoglutarato y oxalacetato, porque son precursores de ciertos aminoácidos (*véase* Sección 5.15); y el succinil-CoA, que se necesita para formar el anillo porfirínico de los citocromos, la clorofila y otros compuestos tetrapirrólicos (*véase* Figura 5.16). El oxalacetato es también importante porque puede convertirse en fosfoenolpiruvato, un precursor a su vez de la glucosa (*véase* Figura 5.25). Además de éstos, el acetil-CoA representa el material de origen para la biosíntesis de ácidos grasos (*véase* Sección 5.15). Por tanto, el ciclo del ácido cítrico tiene dos funciones muy destacadas en la célula: *bioenergética* y *biosintética*. Lo mismo se puede decir acerca de la vía glucolítica, pues muchos intermediarios de tal vía se utilizan también para satisfacer necesidades biosintéticas de la célula.

✓ 5.13 Revisión de conceptos

La respiración es la oxidación completa de un compuesto orgánico con liberación de mucha más energía que durante la fermentación. El ciclo del ácido cítrico desempeña una función fundamental en la respiración de compuestos orgánicos.

- ✓ ¿Cuántas moléculas de CO_2 y cuántos pares de átomos de hidrógeno se liberan por cada *acetato consumido* en el ciclo del ácido cítrico?
- ✓ ¿Qué dos funciones fundamentales tienen en común el ciclo del ácido cítrico y la glucolisis?

V DIVERSIDAD CATABÓLICA Y VISIÓN GLOBAL DE LA BIOSÍNTESIS

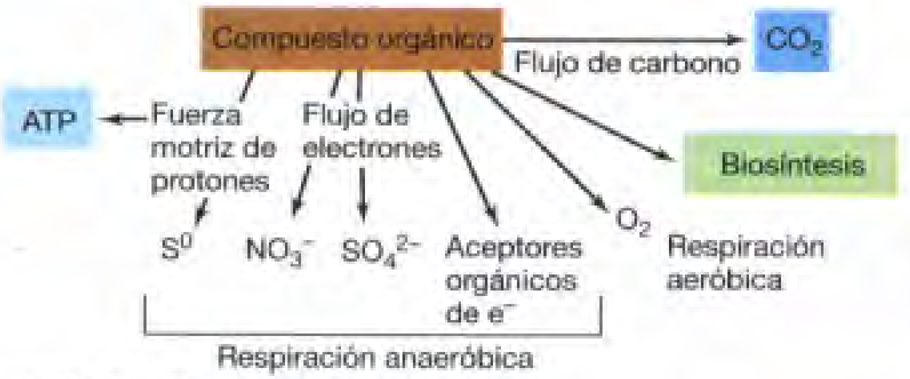
Como se destacó en el Capítulo 2, la base de la diversidad microbiana es la *diversidad metabólica;* en particular, las distintas estrategias que los microorganismos han desarrollado para producir ATP. Hasta ahora hemos considerado en este capítulo solamente reacciones de microorganismos quimioorganotróficos. Ahora consideraremos fuentes de energía alternativas a los compuestos orgánicos y luego terminaremos el capítulo con una presentación general de las reacciones biosintéticas que proporcionan los monómeros necesarios para la formación de macromoléculas.

5.14 Alternativas catabólicas

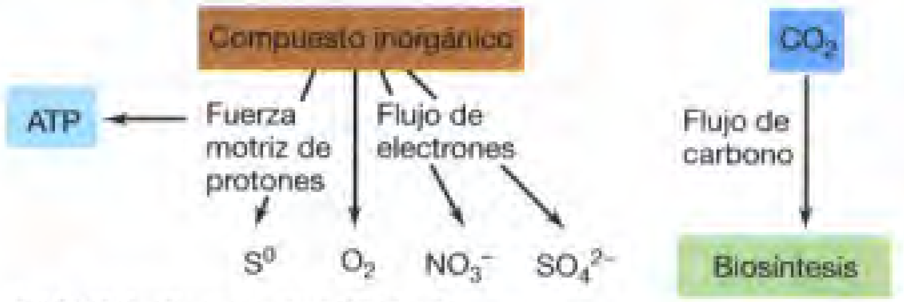
La Figura 5.23 resume los mecanismos por los que las células pueden generar energía por métodos distintos a la fermentación y a la respiración aeróbica. Estos son la respiración anaeróbica, la quimiolitotrofía y la fototrofía.

Respiración anaeróbica

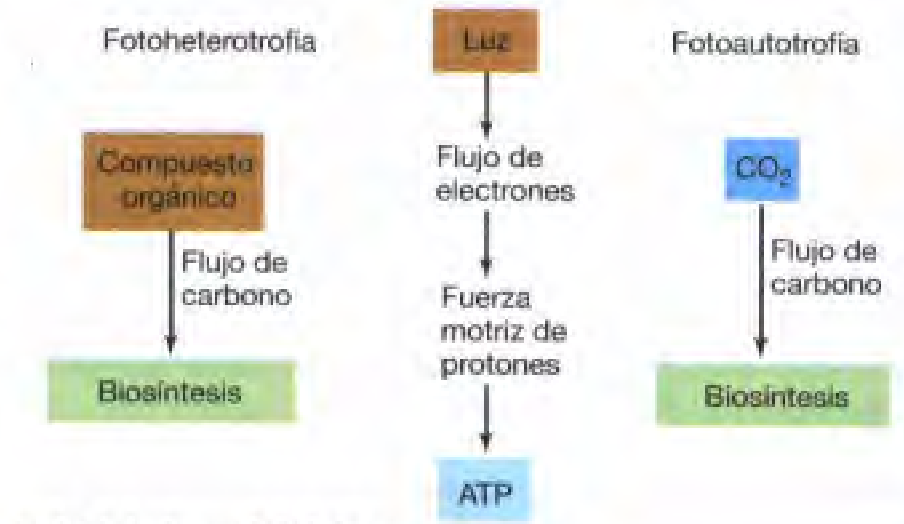
Un método alternativo de generación de energía es una modificación de la respiración en la que se usan aceptores de electrones *diferentes* del oxígeno. A diferencia de la respiración aeróbica, estos procesos se denominan **respiración anaeróbica**. Los aceptores de electrones utilizados en la respiración anaeróbica son nitratos (NO_3^-), hierro férrico (Fe^{3+}), sulfatos (SO_4^{2-}), carbonatos (CO_3^{2-}) e incluso algunos compuestos orgánicos. Debido a sus posiciones en la torre de electrones (ninguno de estos aceptores tiene un E_0' tan electropositivo como el par O_2/H_2O) (*véase* Figura 5.9), se libera menos energía cuando se usan estos aceptores en vez de oxígeno. Sin embargo, el uso de estos aceptores alternativos permite a los microorganismos respirar en ambientes que carecen de oxígeno. Como la solubilidad del O_2 en el agua es más bien baja y se consume tan rápidamente por su elevada demanda como aceptor de electrones, la respiración anaeróbica tiene una importancia ecológica notable. En la Sección 17.13, se trata con más detalle la respiración anaeróbica.


Compuesto orgánico
Flujo de carbono
CO$_2$
ATP
Fuerza motriz de protones
Flujo de electrones
Biosíntesis
S^0
NO$_3^-$
SO$_4^{2-}$
Aceptores orgánicos de e$^-$
O$_2$
Respiración aeróbica
Respiración anaeróbica

(*a*) **Metabolismo quimioorganotrofo**


Compuesto inorgánico
CO$_2$
ATP
Fuerza motriz de protones
Flujo de electrones
Flujo de carbono
S^0
O$_2$
NO$_3^-$
SO$_4^{2-}$
Biosíntesis

(*b*) **Metabolismo quimiolitotrofo**


Fotoheterotrofía
Luz
Fotoautotrofía
Compuesto orgánico
Flujo de electrones
CO$_2$
Flujo de carbono
Fuerza motriz de protones
Flujo de carbono
Biosíntesis
Biosíntesis
ATP

(*c*) **Metabolismo fototrófico**

Figura 5.23 Energética y flujo del carbono en (a) metabolismo quimioorganotrofo respiratorio, (b) metabolismo quimiolitotrofo, y (c) metabolismo fototrofo. Adviértase que en el metabolismo fototrófico el carbono para la biosíntesis puede proceder del CO_2 (fotoautotrofía) o de compuestos orgánicos (fotoheterotrofía). Nótese también en cada caso, la importancia del transporte de electrones que conduce a la fuerza motriz de protones.

Quimiolitotrofía

Un segundo modo de generar energía se basa en el uso de compuestos *inorgánicos* en vez de orgánicos. Los organismos capaces de usar compuestos inorgánicos como donadores de electrones constituyen una clase de quimiotrofos y se llaman **quimiolitotrofos**. Entre los donadores inorgánicos encontramos sulfuro de hidrógeno (H_2S), gas hidrógeno (H_2), hierro ferroso (Fe^{2+}) y amoniaco (NH_3). El metabolismo de los quimiolitotrofos implica normalmente procesos de respiración aeróbica como los que acabamos de describir pero que usan una fuente de energía inorgánica en vez de orgánica (Figura 5.23). Los quimiolitotrofos tienen componentes para el transporte de electrones similares a los de los quimioorganotrofos y originan una fuerza motriz de protones que dirige la síntesis de ATP. Una diferencia importante entre los quimiolitotrofos y los quimioorganotrofos se establece según sus fuentes de *carbono* para la biosíntesis. Los quimioorganotrofos suelen usar compuestos como la glucosa como fuente tanto de carbono como de energía, pero los quimiolitotrofos no pueden usar sus donadores de electrones inorgánicos como fuente de carbono. La mayoría de los quimiolitotrofos usan CO_2 como fuente de carbono y, por tanto, son **autotrofos**. En el Capítulo 17 se presentan muchas formas de quimiolitotrofía.

Fototrofía

Muchos microorganismos, así como las plantas verdes, son *fototróficos*, es decir, utilizan la luz como fuente de energía en el proceso llamado fotosíntesis. Los mecanismos por los que la luz se emplea como energía son singulares y complejos, pero el efecto final es la creación de una fuerza motriz de protones que puede ser usada para la síntesis de ATP. La mayor parte de los fototrofos usan la energía conservada en el ATP para la asimilación del CO_2 como fuente de carbono, para la biosíntesis, y son llamados **fotoautotrofos**. Sin embargo, algunos fototrofos emplean compuestos orgánicos como fuente de carbono y la luz como fuente de energía, que se denominan **fotoheterotrofos** (Figura 5.23). Como se verá en el Capítulo 17, la fotosíntesis en los microorganismos presenta algunas características y complicaciones especiales. Por ejemplo, hay dos tipos de fotosíntesis microbiana, una forma similar a la de las plantas en la que se desprende O_2 y otro tipo único que ocurre sólo en algunos procariotas en la que no existe liberación de O_2.

Importancia de la fuerza motriz de protones para alternar las estrategias bioenergéticas

Desde el punto de vista del metabolismo energético los microorganismos muestran una sorprendente diversidad de estrategias para obtener energía. Miles de compuestos orgánicos, muchos compuestos inorgánicos y la luz pueden servir como fuente de energía a uno u otro microorganismo. Sin embargo, excepto en el caso de la fermentación, donde predomina la fosforilación a nivel de sustrato, la diversidad en cuanto a la respiración y a la fotosíntesis gira en torno a un tema común: la generación de una fuerza motriz de protones. Independientemente de si los electrones proceden de la oxidación de un compuesto orgánico o inorgánico o de procesos fotosintéticos, todos ellos circulan por un sistema de transporte de electrones asociado a la membrana y generan una fuerza motriz de protones (Figura 5.20). En todos los casos, la conservación de la energía es posible mediante la función de la ATPasa (Figura 5.21). En el Capítulo 17, se examinarán más detenidamente los detalles de las diferentes estrategias bioenergéticas que dan como resultado la producción de la fuerza motriz de protones.

✓ 5.14 Revisión de conceptos

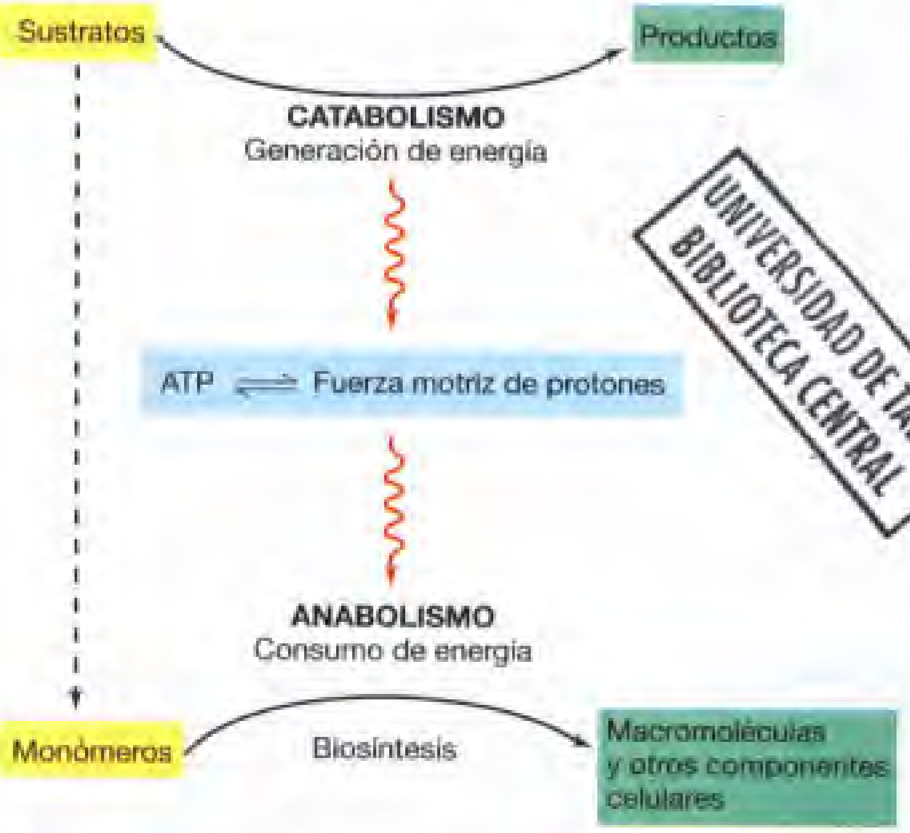
Otros aceptores de electrones diferentes del oxígeno pueden funcionar como aceptores finales para la generación de energía. En ausencia de oxígeno, este proceso de denomina respiración anaeróbica. Los quimiolitotrofos usan compuestos inorgánicos como donadores de electrones, mientras que los fototrofos usan la luz para originar la fuerza motriz de protones. En todas las formas de respiración o fotosíntesis se genera la fuerza motriz de protones.

- ✓ Diferencie entre los quimioorganotrofos y los quimiolitotrofos en cuanto a sus donadores de electrones.
- ✓ ¿Cuál es la fuente de carbono de los microorganismos autotróficos?
- ✓ ¿En qué se diferencian los *fotoautotrofos* de los *fotoheterotrofos*?

5.15 Biosíntesis de monómeros

Hasta ahora hemos considerado el **catabolismo**, es decir, los procesos por los que los microorganismos obtienen energía de los compuestos orgánicos. Consideraremos ahora brevemente otra serie importante de reacciones que ocurren en la célula y que constituyen el **anabolismo**, esto es, los procesos que permiten construir la amplia variedad de sustancias de las que se componen.

La energía para el anabolismo la suministra el ATP o la fuerza motriz de protones, que son diferentes formas de energía química (Figura 5.24). Esta energía generada durante el catabolismo se consume tanto en la formación de monómeros como durante la polimerización de los monómeros para formar las respectivas macromoléculas. Nues-



UNIVERSIDAD DE TALCA
BIBLIOTECA CENTRAL

Figura 5.24 Esquema del anabolismo y catabolismo mostrando la función fundamental del ATP y de la fuerza motriz de protones en la integración de los procesos. Los monómeros pueden proceder como nutrientes preformados del medio o de las rutas catabólicas como la glucolisis o el ciclo del ácido cítrico.

tro tratamiento aquí de las rutas biosintéticas sólo intenta aportar una visión global de la síntesis de los monómeros más importantes; la biosíntesis de macromoléculas se trata en el Capítulo 7.

Monómeros de los polisacáridos: azúcares

Los polisacáridos son constituyentes de las paredes celulares de muchos organismos y de las bacterias, pues recordemos que el peptidoglicano de la pared celular tiene un esqueleto polisacarídico. Además, las células acumulan a menudo carbono y energía en forma de los polisacáridos *almidón* y *glucógeno* (*véanse* Secciones 3.3 y 4.13). Las unidades monoméricas de estos polisacáridos son azúcares de seis carbonos llamados *hexosas*, particularmente glucosa o derivados de glucosa. Además de las hexosas, en la célula también son comunes los azúcares de cinco carbonos llamados *pentosas*. Estos incluyen la ribosa y la desoxiribosa que están presentes en el RNA y DNA, respectivamente.

En los procariotas los polisacáridos se sintetizan a partir de *uridina difosfoglucosa* (UDPG, Figura 5.25*a*) o bien *adenosina difosfoglucosa* (ADPG), que son formas *activadas* de la glucosa. ADPG es el precursor para la biosíntesis del glucógeno, mientras que UDPG es el precursor de varios derivados de glucosa necesarios para la biosíntesis de otros polisacáridos celulares, como el peptidoglicano o el lipopolisacárido de la membrana externa de bacterias Gram negativas (*véanse* Secciones 4.8 y 4.9).

Cuando una célula crece utilizando una hexosa como la glucosa, resulta obvio que la obtención de glucosa no supone ningún problema. Pero cuando la célula crece sobre otros compuestos carbonados, debe sintetizar glucosa. Este proceso, llamado *gluconeogénesis*, usa como material inicial el *fosfoenolpiruvato*, uno de los intermediarios de la glucolisis (*véase* Figura 5.14). El fosfoenolpiruvato se puede sintetizar a partir del oxalacetato, un intermediario del ciclo del ácido cítrico. Una visión general del metabolismo de las hexosas se expone en la Figura 5.25.

Las pentosas se forman a partir de hexosas mediante la pérdida de un átomo de carbono, por lo general como CO_2 (Figura 5.25*c*). Las pentosas que se requieren para la síntesis de los ácidos nucleicos, es decir, la ribosa y la desoxiribosa, se forman como se indica en la Figura 5.25*c*. La enzima *ribonucleótido reductasa* convierte la ribosa en desoxirribosa por reducción del carbono 2′ del anillo. Resulta interesante que esta reacción ocurre *después*, no antes, de la síntesis de nucleótidos, de modo que los ribonucleótidos son sintetizados en primer lugar y luego algunos de ellos se reducen a desoxirribonucleótidos que actúan como precursores de DNA.

Monómeros de proteínas: aminoácidos

Los organismos que no pueden obtener alguno o todos los aminoácidos preformados del medio deben sintetizarlos a partir de otras fuentes. Los aminoácidos se pueden agrupar en *familias*, relacionadas estructuralmente, que comparten propiedades biosintéticas (Figura 5.26). Los esqueletos carbonados de los aminoácidos derivan, casi exclusivamente,

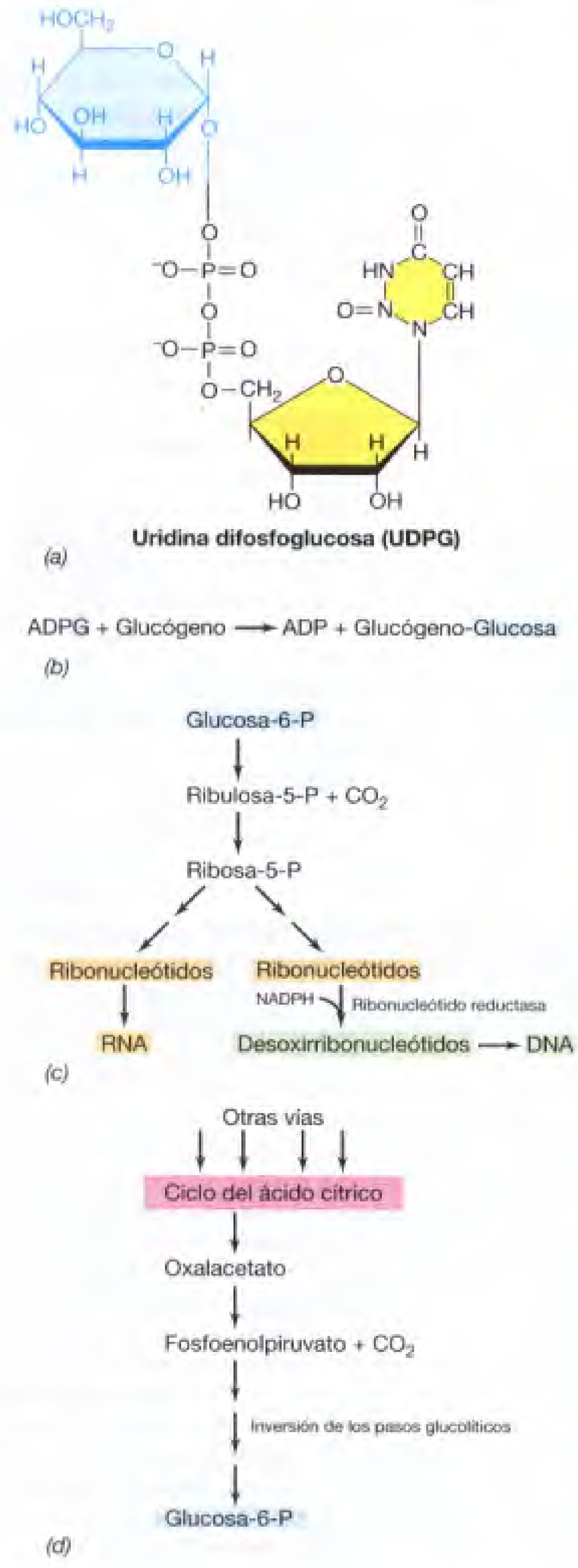


Figura 5.25 Metabolismo de azúcares. (a) Los polisacáridos se sintetizan a partir de formas activadas de las hexosas como UDPG, cuya estructura se indica. (b) El glucógeno se sintetiza de la adenosina-fosfoglucosa (ADPG) por adición secuencial de glucosa. (c) Las pentosas para la síntesis de ácidos nucleicos se forman por decarboxilación de las hexosas como glucosa-6-fosfato. Los precursores de DNA se producen a partir de los precursores de RNA por la enzima ribonucleótido reductasa. (d) Gluconeogénesis. Cuando se necesita glucosa, se puede biosintetizar de otros compuestos carbonados, invirtiendo por lo general los pasos de la glucolisis.

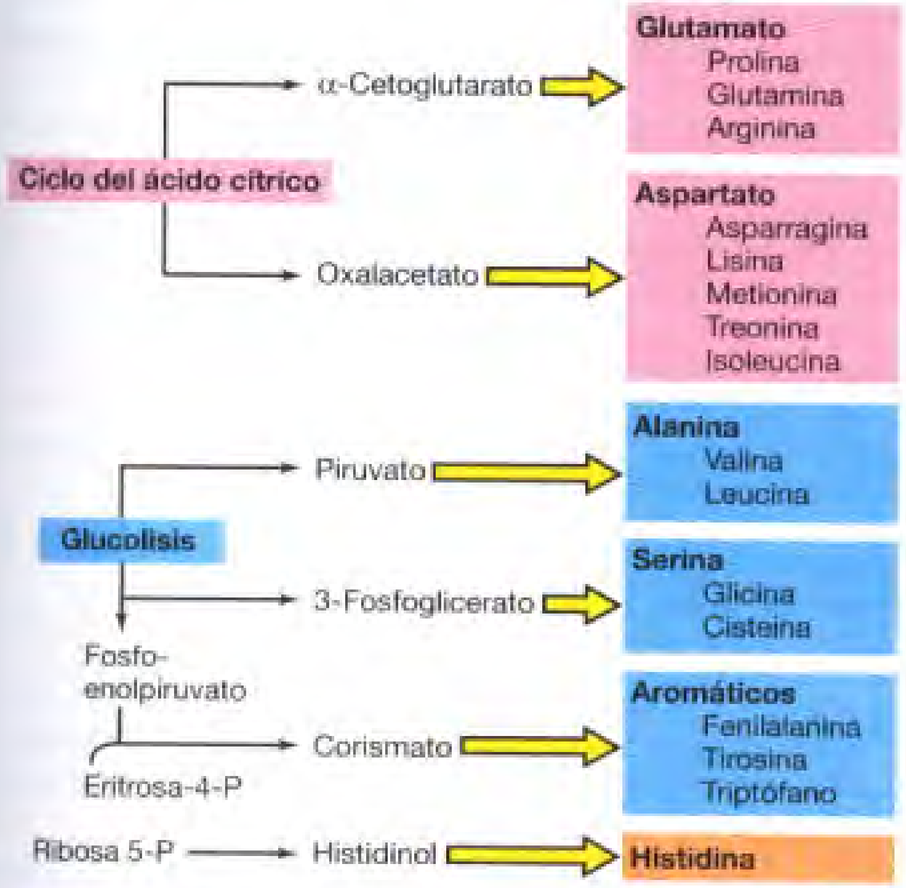

Glutamato
Prolina
Glutamina
Arginina
α-Cetoglutarato
Ciclo del ácido cítrico
Aspartato
Asparragina
Lisina
Metionina
Treonina
Isoleucina
Oxalacetato
Alanina
Valina
Leucina
Piruvato
Glucolisis
Serina
Glicina
Cisteína
3-Fosfoglicerato
Fosfo-
enolpiruvato
Aromáticos
Fenilalanina
Tirosina
Triptófano
Corismato
Eritrosa-4-P
Ribosa 5-P
Histidinol
Histidina

Figura 5.26 Familias de aminoácidos. Observe cómo el esqueleto carbonado de la mayoría de los aminoácidos deriva del ciclo del ácido cítrico o de la glucolisis. La síntesis de aminoácidos de una familia requiere a menudo muchos pasos distintos catalizados enzimáticamente a partir del aminoácido parental (mostrado en negrita).

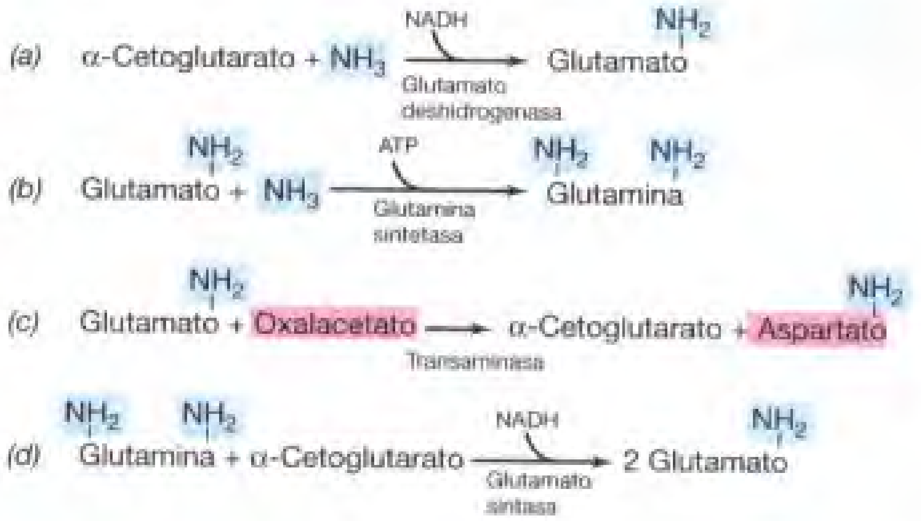

(a)
α-Cetoglutarato + NH_3
NADH
Glutamato deshidrogenasa
NH_2
Glutamato
(b)
NH_2
Glutamato + NH_3
ATP
Glutamina sintetasa
NH_2 NH_2
Glutamina
(c)
NH_2
Glutamato + Oxalacetato
Transaminasa
α-Cetoglutarato + Aspartato
NH_2
(d)
NH_2 NH_2
Glutamina + α-Cetoglutarato
NADH
Glutamato sintasa
NH_2
2 Glutamato

Figura 5.27 Incorporación de aminoácidos en bacterias. El amoniaco y los grupos amino de todos los aminoácidos se indican en azul. Las dos vías principales de asimilación de NH_3 en bacterias son las catalizadas por las enzimas (a) glutamato deshidrogenasa y (b) glutamina sintetasa. (c) Las reacciones de transaminasa transfieren simplemente un grupo amino de un aminoácido a un ácido orgánico. (d) En la reacción catalizada por la enzima glutamato sintetasa, se forman dos glutamatos a partir de una glutamina y de un α-cetoglutarato.

de intermediarios de la glucolisis o del ciclo del ácido cítrico (Figura 5.26).

El *grupo amino* de los aminoácidos procede con frecuencia de alguna fuente nitrogenada inorgánica del medio, como el amoniaco (NH_3) que típicamente se incorpora en la formación de los aminoácidos *glutamato* o *glutamina* por las enzimas *glutamato deshidrogenasa* o *glutamina sintetasa*, respectivamente (Figura 5.27*a*, *b*). Una vez que el amoniaco se ha incorporado, puede ser luego transferido para formar otros compuestos nitrogenados requeridos. Por ejemplo, el glutamato puede donar su grupo amino al oxalacetato mediante una reaccion de *transaminación* para formar α-cetoglutarato y aspartato (Figura 5.27*c*). Alternativamente, la glutamina puede reaccionar con el α-cetoglutarato para formar dos moléculas de glutamato en una reacción catalizada por una *aminotransferasa* (Figura 5.27*d*). El resultado final de este tipo de reacciones es la incorporación del amoniaco en varios esqueletos carbonados a partir de los cuales ocurren posteriores reacciones biosintéticas que permiten formar los 20 aminoácidos necesarios para sintetizar proteínas.

Monómeros de ácidos nucleicos: nucleótidos

La biosíntesis de las purinas y las pirimidinas es bastante complicada. Las purinas se forman literalmente átomo a átomo a partir de varias fuentes carbonadas y nitrogenadas, incluyendo CO_2 (Figura 5.28*a*). El *ácido inosínico* (Figura 5.28*b*) es el primer eslabón que actúa como precursor de todos los otros nucleótidos con purinas; una vez que éstos se sintetizan (en su forma de trifosfatos) están listos para ser incorporados en el DNA o el RNA (*véanse* Secciones 7.5-7.11). De modo análogo, el anillo de las pirimidinas también se forma a partir de varias fuentes (Figura 5.28*c*) y el primer compuesto clave es el *uridilato*, a partir del cual derivan todas las otras pirimidinas (Figura 5.28*d*).

Monómeros de lípidos: ácidos grasos

Los ácidos grasos se necesitan para la biosíntesis de lípidos en *Bacteria* y en *Eukarya* (*véanse* Secciones 3.4 y 4.5). Los ácidos grasos se sintetizan en bloques de dos átomos de carbono con ayuda de una pequeña proteína llamada *proteína transportadora de grupos acilo* (ACP, del inglés *acyl carrier protein*). A medida que está siendo sintetizado, la ACP está unida al ácido graso en crecimiento y se libera de él una vez que ha alcanzado la longitud adecuada, como ocurre con el palmitato, un ácido graso muy común de 16 átomos de carbono (Figura 5.29; Figura 3.7). Aunque el ácido graso se va construyendo por bloques sucesivos de *dos* carbonos, resulta interesante que estos dos carbonos los dona cada vez un compuesto de *tres* carbonos, el malonato unido a ACP en forma de malonil-ACP; por cada residuo de malonil que se incorpora, se libera una molécula de CO_2 (Figura 5.29).

La composición celular en ácidos grasos varía de especie a especie y dentro de una especie determinada puede variar también en función de la temperatura (el crecimiento a baja temperatura favorece la síntesis de ácidos grasos de cadena corta), pero los ácidos grasos C_{14}-C_{18} son los más comunes en *Bacteria*. Además de ácidos grasos saturados y de número par de átomos de carbono, los ácidos grasos pueden ser también no saturados, ramificados o contener un número impar de átomos de carbono. Los *no saturados* contienen uno o más dobles enlaces en la larga porción hidrofóbica de la molécula, y el número y posición de estos dobles enlaces es con frecuencia específico para cada especie o grupo. Los ácidos grasos *ramificados* o de *cadena impar*

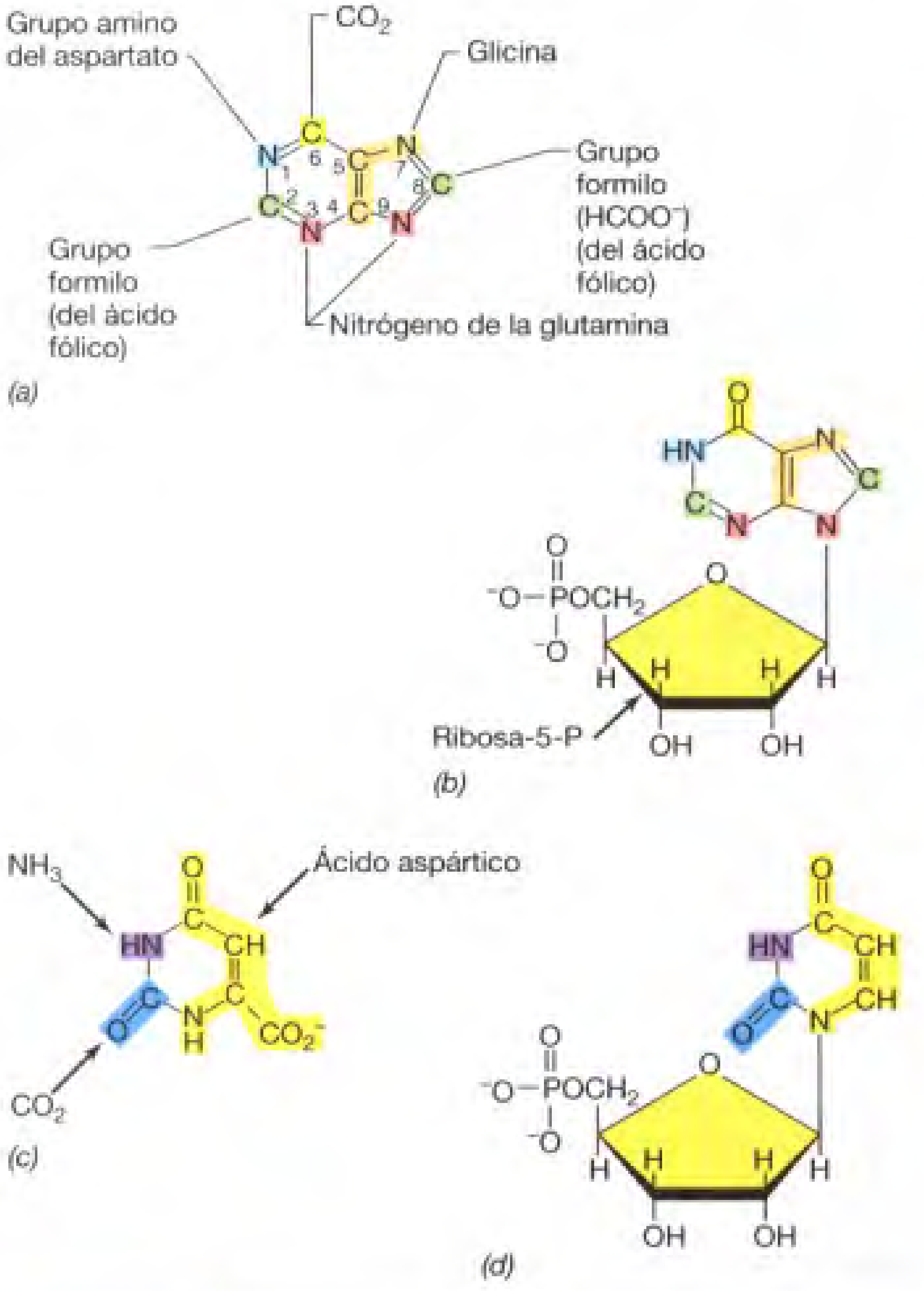

Grupo amino del aspartato
CO₂
Glicina
Grupo formilo (HCOO⁻) (del ácido fólico)
Grupo formilo (del ácido fólico)
Nitrógeno de la glutamina
(a)
Ribosa-5-P
(b)
NH₃
Ácido aspártico
CO₂
(c)
(d)

Figura 5.28 Biosíntesis de purinas y pirimidinas. (a) Precursores del esqueleto de las purinas. (b) Ácido inosínico, el precursor de todos los nucleótidos de purinas. (c) Precursores del esqueleto de las pirimidinas, el ácido orótico. (d) Uridilato, precursor de todos los nucleótidos de pirimidinas. El uridilato se forma del orotato tras una descarboxilación y la adición de ribosa-5-fosfato.

de átomos de carbono se forman a partir de una molécula iniciadora que contiene una cadena ramificada o a partir de un grupo propionil (C_3), respectivamente.

El ensamblaje final de los lípidos en *Bacteria* y *Eukarya* supone la adición de los ácidos grasos a una molécula de glicerol. En el caso de los triglicéridos simples, los tres carbonos del glicerol se esterifican con ácidos grasos, pero en el caso de los lípidos complejos uno de los carbonos del glicerol contiene una molécula de fosfato, etanolamina, un azúcar o algún otro compuesto polar (*véase* Figura 3.7). En *Arqueas*, los lípidos contienen cadenas de fitano en vez de ácidos grasos (*véase* Sección 4.5) pero, como en *Bacteria* y *Eukarya*, el tercer carbono del glicerol normalmente contiene un grupo polar de algún tipo.

Biosíntesis y crecimiento

Hemos visto los principios básicos de la biosíntesis de los monómeros necesarios para la síntesis de macromoléculas, que constituyen la esencia misma de la célula (*véase* Tabla 3.2). Antes de considerar cómo dirige la célula la síntesis de sus macromoléculas, sobre todo de las macromoléculas que llevan información, examinaremos el fenómeno del crecimiento celular. El crecimiento (y la multiplicación) es el resultado final de todas las reacciones catabólicas y anabólicas que hemos considerado en este capítulo. Una vez que conozcamos los principios del crecimiento microbiano y comprendamos los factores ambientales que lo controlan, estaremos en condiciones de estudiar los detalles del «flujo de la información» y de la genética, y comprenderemos que la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas está coordinada en la célula procariótica.

✓ 5.15 Revisión de conceptos

La biosíntesis de monómeros a partir de nutrientes del medio o de intermediarios del catabolismo prepara a la célula para el paso final de la biosíntesis, la síntesis de macromoléculas. Existe una gran variedad de sistemas enzimáticos y de rutas biosintéticas para la biosíntesis de azúcares, aminoácidos, nucleótidos y ácidos grasos.

- ✓ ¿Qué formas activadas de la glucosa intervienen en la biosíntesis de polisacáridos o de otras hexosas?
- ✓ ¿De dónde proceden la mayoría de los esqueletos carbonados de los aminoácidos?
- ✓ Explique por qué los ácidos grasos se forman mediante la adición de bloques de *dos* átomos de carbono, mientras el donador de éstos contiene *tres* átomos de carbono.

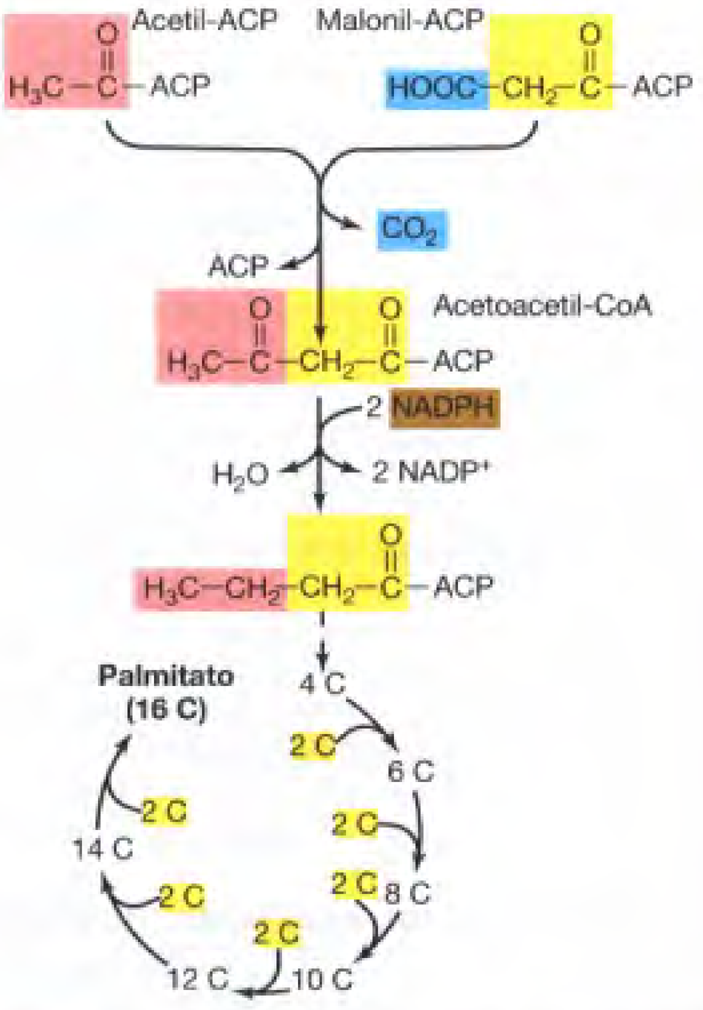


Figura 5.29 Biosíntesis de ácidos grasos; se indica la síntesis del ácido graso C_{16} *palmitato* (*véase* Figura 3.7). La condensación de acetil-ACP y malonil-ACP forma acetoacetil-CoA. Cada adición sucesiva de unidades de acetilo procede del malonil-CoA

Preguntas de repaso

1. Defina los términos *quimioorganotrofo*, *quimiolitotrofo*, *fotoautotrofo* y *fotoheterotrofo*.
2. ¿Por qué el *carbono* y el *nitrógeno* son macronutrientes y el cobalto es micronutriente?
3. ¿Qué son los sideróforos y para qué se usan?
4. Por qué el siguiente medio *no* puede ser considerado un medio definido: glucosa, 5 gramos (g); NH_4Cl, 1 g; KH_2PO_4, 1 g; $MgSO_4$, 0,3 g; extracto de levadura, 5 g; agua destilada, 1 litro.
5. Describa cómo calcularía el valor $\Delta G^{0\prime}$ en la reacción: glucosa + 6 $O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$. Si se le dijera que esta reacción es muy *exotérmica*, ¿cual sería el signo (negativo o positivo) de $\Delta G^{0\prime}$?
6. Diferencie entre $\Delta G^{0\prime}$ y $\Delta G^{0}{}_{i}$.
7. ¿Para qué necesita la célula enzimas?
8. Explique por qué una enzima de la bacteria *Escherichia coli* pierde su actividad catalítica si se hierve.
9. Describa la diferencia entre una *coenzima* y un *grupo prostético*.
10. La siguiente lista es una serie de donadores y aceptores de electrones acoplados. Usando los datos de la Figura 5.9, ordene esta serie en función de la energía producida de mayor a menor: H_2/Fe^{3+}, H_2S/O_2, metanol/NO_3^- (produciendo NO_2^-), H_2/O_2, Fe^{2+}/O_2, NO_2^-/Fe^{3+}, H_2S/NO_3^-.
11. ¿Qué es un transportador de electrones? Dé tres ejemplos de transportadores de electrones e indique sus formas oxidadas y reducidas.
12. La reacción glucosa-6-fosfato + ADP → glucosa + ATP, ¿es exotérmica o endotérmica? Observe la Figura 5.12 para responder a esta pregunta.
13. Durante la glucolisis, señale dónde se *produce* NADH y dónde se *consume*.
14. El hierro tiene una función importante dentro de la célula en procesos que generan energía. Cite tres ejemplos en los que el hierro intervenga como transportador de electrones. ¿Cómo se suministra el hierro como nutriente en los medios de cultivo?
15. Comente el significado del término *fuerza motriz de protones* y por qué este concepto es tan importante en biología.
16. ¿Cómo se utiliza la energía rotacional de la ATPasa para producir ATP?
17. El dinitrofenol y el cianuro actúan como venenos celulares de modo muy diferente. Compare y diferencie los modos de acción de estos dos compuestos.
18. Indique simplificadamente la ecuación de la reacción redox de un citocromo. ¿Sugiere alguna función para la porción de la molécula de citocromo que *no* está implicada en la oxidación-reducción?
19. Considerando la función de la cadena de transporte de electrones, ¿podría imaginarse la existencia de un organismo que careciera por completo de los componentes necesarios para el transporte de electrones? (*Pista:* centre su respuesta en el mecanismo de la ATPasa).
20. Repase el balance energético de la fermentación y la respiración definiendo todos los pasos que permiten síntesis de ATP. Los organismos pueden obtener aproximadamente 20 veces más ATP cuando crecen aeróbicamente sobre glucosa que anaeróbicamente. Escriba una frase que explique esta diferencia.
21. ¿Por qué se dice que el ciclo del ácido cítrico desempeña *dos* funciones importantes en la célula?
22. ¿Cuáles son la similitudes y las diferencias entre la respiración aeróbica del quimioorganotrofo *Escherichia coli* y del quimiolitotrofo *Thiobacillus thioparus*?
23. La Figura 5.26 indica que sólo unos cuantos intermediarios sirven como punto de partida para la biosíntesis de aminoácidos. Para cada una de las familias de aminoácidos, identifique el componente inicial y en qué ruta metabólica puede encontrarse.
24. Describa el proceso por el que se sintetiza en la célula un ácido graso saturado como el palmitato (C_{16}).
25. ¿A qué nos referimos con el término «técnica aséptica»? Describa los pasos a seguir en la transferencia eficaz de un cultivo axénico o puro desde su tubo de cultivo a un tubo con medio estéril.
26. Si tiene un cultivo líquido conteniendo tres especies diferentes de bacterias, ¿cómo podría confirmarlo usando una placa Petri? ¿Cómo podría utilizar la placa Petri para generar cultivos axénicos o puros de cada organismo? ¿Hay algún otro modo por el que pudiera detectar la contaminación en un cultivo? (*Pista:* revise rápidamente el material del principio del Capítulo 4 antes de contestar).
27. Observe el modelo de la enzima lisozima en la Figura 5.7. ¿Cuál es el sustrato para esta enzima? (*Pista:* una revisión rápida del material en al Sección 4.8 le ayudará aquí). ¿Dónde se une el sustrato? ¿Por qué puede encontrarse la lisozima en secreciones naturales del cuerpo tal como los fluidos que bañan el ojo?
28. ¿Por qué puede decirse que el NADH es un «transportador electrónico»? ¿Qué figura de este capítulo ilustra esta acción transportadora?
29. Para que una reacción produzca ATP, ¿cuál es la cantidad mínima de energía que debe liberarse para que se sintetice ATP a partir de ADP? En la Figura 5.14, ¿qué reacciones enzimáticas liberan energía que se conserva como ATP?
30. ¿Cuál es la fuente de carbono de la mayoría de las bacterias quimiolitotróficas? ¿Por qué tiene sentido considerando la naturaleza de sus donadores de electrones?

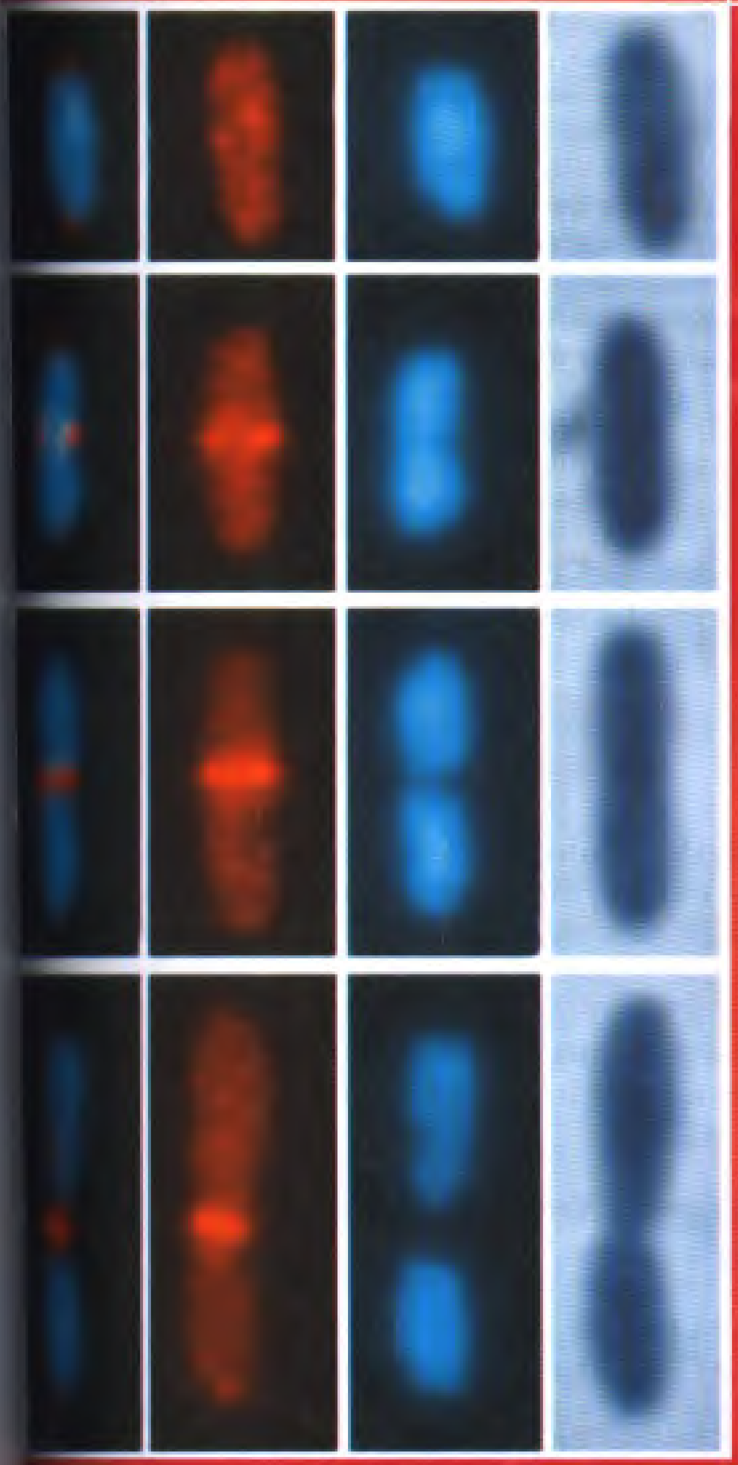
Ejercicios prácticos

1. Diseñe un medio de cultivo definido para un organismo que puede crecer aeróbicamente sobre acetato como fuente de carbono y energía. Compruebe que todos los nutrientes requeridos por el organismo están presentes y en las proporciones relativas correctas.
2. *Desulfovibrio* puede crecer anaeróbicamente con H_2 como donador de electrones y SO_4^{2-} como aceptor de electrones (que es reducido hasta H_2S). Con esta información y los datos de la Tabla A1.2 del Apéndice 1, indique cuál de los siguientes componentes *no podría* existir en la cadena de transporte de electrones de este organismo y por qué: citocromo *c*, ubiquinona, citocromo c_3, citocromo aa_3, ferredoxina.
3. De nuevo, utilizando los datos de la Tabla A1.2, prediga la secuencia de transportadores de electrones en un organismo que crece aeróbicamente y contiene los siguientes transportadores: ubiquinona, citocromo aa_3, citocromo *b*, NADH, citocromo *c*, FAD.
4. Explique la siguiente observación: las células de *Escherichia coli* que fermentan glucosa crecen más rápido si se añade NO_3^- al cultivo (produciéndose NO_2^-) y luego crecen aún más rápido (a la vez que dejan de producir NO_2^-) cuando al cultivo se suministra aireación.
5. Teniendo en cuenta la glucolisis, el ciclo del ácido cítrico y la gluconeogénesis, explique por qué un mutante de *Escherichia coli* que contiene una malato deshidrogenasa defectiva (que no puede realizar la reacción malato^{2-} + NAD + $\rightarrow$ oxalacetato^{2-} + NADH + H^+) (*véase* Figura 5.22) es capaz de crecer sobre glucosa pero no sobre acetato, mientras que cepas silvestres de *E. coli* no mutadas pueden crecer sobre ambos sustratos.

La división celular origina dos células a partir de una. En las bacterias con forma bacilar este proceso suele ocurrir mediante *fisión binaria*, que consiste en el alargamiento gradual de una célula y su posterior separación en dos células. La división celular requiere proteínas específicas, como la proteína *FtsZ* que se muestra aquí mediante tinción de las células. Para iniciar el proceso de división se depositan copias de *FtsZ* formando un anillo que identifica el punto medio de la célula. Una vez que ha ocurrido esto, se activan otras proteínas específicas de la división celular y se pone en marcha una serie de etapas que culminan en el proceso real de división.

6

CRECIMIENTO MICROBIANO



I TEORÍA Y PRÁCTICA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO 138

6.1 Crecimiento celular y fisión binaria 138
6.2 Síntesis del peptidoglicano y división celular 140
6.3 Crecimiento de poblaciones 142
6.4 Curva de crecimiento 144
6.5 Medidas directas del crecimiento microbiano: recuento de células totales y viables 145
6.6 Medidas indirectas del crecimiento microbiano: turbidez 148
6.7 Cultivo continuo: el quimiostato 148

II EFECTOS AMBIENTALES SOBRE EL CRECIMIENTO MICROBIANO 151

6.8 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento 151
6.9 Crecimiento microbiano a bajas temperaturas 153
6.10 Crecimiento microbiano a altas temperaturas 155
6.11 Crecimiento microbiano a pH alto y a pH bajo 158
6.12 Efectos osmóticos sobre el crecimiento microbiano 159
6.13 Oxígeno y crecimiento microbiano 161

Glosario

Acidófilo un organismo que crece mejor a pH bajo

Aerobio un organismo que puede usar el O_2 en la respiración; algunos requieren O_2 para el crecimiento

Alcalófilo un organismo que crece mejor a pH alto

Anaerobio un organismo que no puede usar el O_2 en la respiración y cuyo crecimiento puede ser inhibido por el O_2

Anaerobio aerotolerante un microorganismo incapaz de respirar con oxígeno molecular (O_2) pero que no es afectado por la presencia de O_2

Autolisis lisis celular espontánea, normalmente debida a la actividad de proteínas líticas llamadas autolisinas

Crecimiento incremento en el número de células

Crecimiento exponencial crecimiento de un microorganismo cuyo número de células se duplica en un periodo constante de tiempo

Cultivo monofásico o en batch cultivo microbiano que funciona como un sistema cerrado de volumen constante

Divisoma complejo proteico implicado en procesos de división celular en procariotas

Extremófilo un organismo que crece de modo óptimo en una o más condiciones físicas o químicas extremas, como por ejemplo a alta o baja temperatura o pH

Facultativo con respecto al O_2, un organismo que puede crecer en su ausencia o en su presencia

Fase estacionaria el periodo que sigue al crecimiento exponencial cuando la velocidad de crecimiento de la población es cero

Fase lag periodo anterior a la fase de crecimiento exponencial cuando las células pueden tener un metabolismo activo pero aún no crecen

Fisión binaria división celular que sigue al aumentar una célula dos veces su tamaño mínimo

FtsZ una proteína clave en la división celular que forma un anillo a lo largo del plano de división para iniciar la elongación celular

Halófilo extremo un microorganismo que requiere para crecer grandes cantidades de sal (NaCl), por lo general superiores al 10% y a veces próximas a la saturación

Halófilo un microorganismo que requiere sal (NaCl) para crecer

Halotolerante un organismo que no requiere sal (NaCl) para crecer pero que puede crecer en su presencia, en algunos casos, a niveles salinos elevados

Hipertermófilo microorganismo que tiene una temperatura óptima de 80°C o superior

Mesófilo un organismo que crece mejor a temperaturas entre 20°C y 45°C

Microaerófilo organismo aeróbico que puede crecer sólo cuando la presión parcial del oxígeno es menor que la del aire

pH valor negativo del logaritmo de la concentración de iones hidrógeno (H^+) en una solución

Psicrófilo organismo con una temperatura óptima de crecimiento de 15°C o menor y una temperatura máxima de crecimiento inferior a 20°C

Psicrotolerante organismo capaz de crecer a bajas temperaturas pero cuya temperatura óptima de crecimiento está por encima de 20°C

Quimiostato aparato que permite el cultivo continuo de microorganismos en el que se pueden controlar independientemente la velocidad de crecimiento y el número de células

Soluto compatible una molécula que se acumula en el citoplasma para ajustar la actividad de agua y que no inhibe los procesos bioquímicos

Temperaturas cardinales las temperaturas mínima, óptima y máxima que permiten el crecimiento de un organismo determinado

Termófilo organismo cuya temperatura óptima de crecimiento está entre 45°C y 80°C

Tiempo de generación el tiempo necesario para que una población de células microbianas duplique su número

Traspeptidación formación de puentes peptídicos entre las unidades de ácido nacetil murámico durante la síntesis de peptidoglicano

Xerófilo organismo que es capaz de vivir, o que vive mejor, en ambientes muy secos

I TEORÍA Y PRÁCTICA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

Hasta ahora hemos tratado de la estructura de las macromoléculas celulares (*véase* Capítulo 3), de la relación entre estructura y función (*véase* Capítulo 4), y de los principios generales de la nutrición microbiana y del metabolismo (*véase* Capítulo 5). Antes de comenzar el estudio de la biosíntesis de macromoléculas y de la genética molecular de los microorganismos (*véase* Capítulo 7), vamos a considerar algunos aspectos del crecimiento microbiano.

En microbiología, la palabra **crecimiento** se define como *un incremento en el número de células*. El crecimiento es un componente esencial de la función microbiana, ya que en la naturaleza cualquier célula tiene un periodo de vida finito y la especie se mantiene como resultado del crecimiento continuo de la población. Además de la comprensión de los aspectos básicos del crecimiento microbiano, muchas situaciones prácticas hacen necesario el *control* del crecimiento microbiano. El conocimiento de cómo las poblaciones bacterianas se amplifican rápidamente es muy útil para el diseño de métodos de control del crecimiento microbiano; estudiaremos estos métodos en el Capítulo 20.

6.1 Crecimiento celular y fisión binaria

La célula bacteriana es una máquina sintética capaz de duplicarse a sí misma. Los procesos bioquímicos del crecimiento celular bacteriano suponen no menos de 2000 reacciones de una gran variedad de tipos. Algunas de estas reacciones son transformaciones de la energía. Otras suponen la biosíntesis de pequeñas moléculas, las unidades básicas de las macromoléculas, así como los diversos cofactores y coenzimas necesarios para las reacciones enzimáticas. Sin embargo, las principales reacciones celulares sintéticas consisten en *reacciones de polimerización*, por las que los polímeros (macromoléculas) se forman a partir de los monómeros. Una vez que se fabrican los polímeros, está dispuesto el escenario para los procesos finales del crecimiento: el ensamblaje de las macromoléculas y la formación de las estructuras celulares como pared celular, membrana citoplasmática, flagelos, ribosomas, cuerpos de inclusión, complejos enzimáticos, etc.

Fisión binaria

En la mayoría de los procariotas, el crecimiento de una célula individual continúa hasta que se divide en dos células nuevas, un proceso que se denomina **fisión binaria** (*binaria* expresa el hecho de que se forman *dos* células a partir de una). En un cultivo en crecimiento de un bacilo como por ejemplo *Escherichia coli*, se observa que las células se alargan hasta aproximadamente el doble de la longitud de la célula más pequeña y luego forma un tabique que acaba por separar la célula en dos células hijas (Figura 6.1). Este tabique se conoce como *septo* y es el resultado del crecimiento hacia dentro de la membrana citoplasmática y la pared celular desde direcciones opuestas hasta que las dos células hijas se separan (Figura 6.1).

Durante el ciclo de crecimiento, todos los constituyentes celulares aumentan, de modo que cada célula hija recibe un cromosoma completo y suficientes copias de todas las macromoléculas, monómeros e iones inorgánicos, como para existir como célula independiente. El reparto del DNA replicado entre las dos células hijas depende de la unión del DNA a la membrana durante la división, y la segregación real de las dos copias es facilitada por la formación del septo (Figura 6.1).

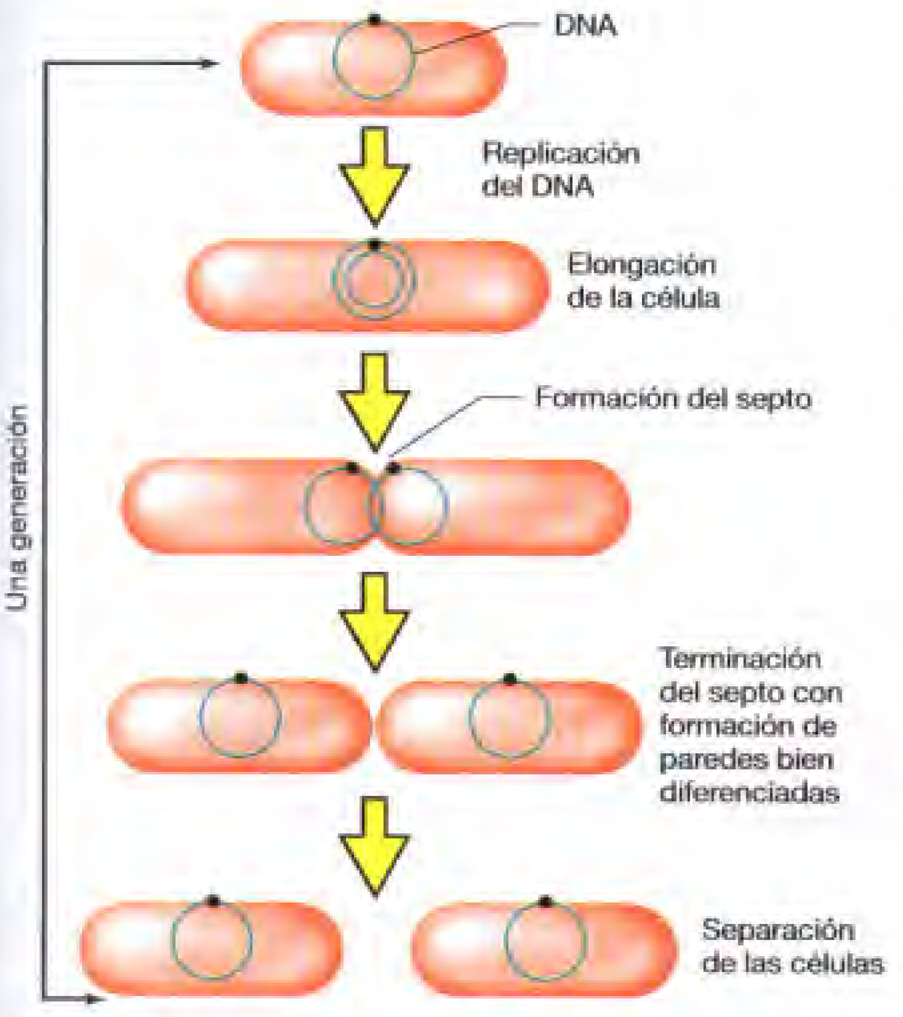

DNA
Replicación del DNA
Elongación de la célula
Formación del septo
Una generación
Terminación del septo con formación de paredes bien diferenciadas
Separación de las células

Figura 6.1 Proceso general de la fisión binaria en un procariota con forma de bacilo. Para simplificar, el nucleoide se representa como un círculo sencillo en verde.

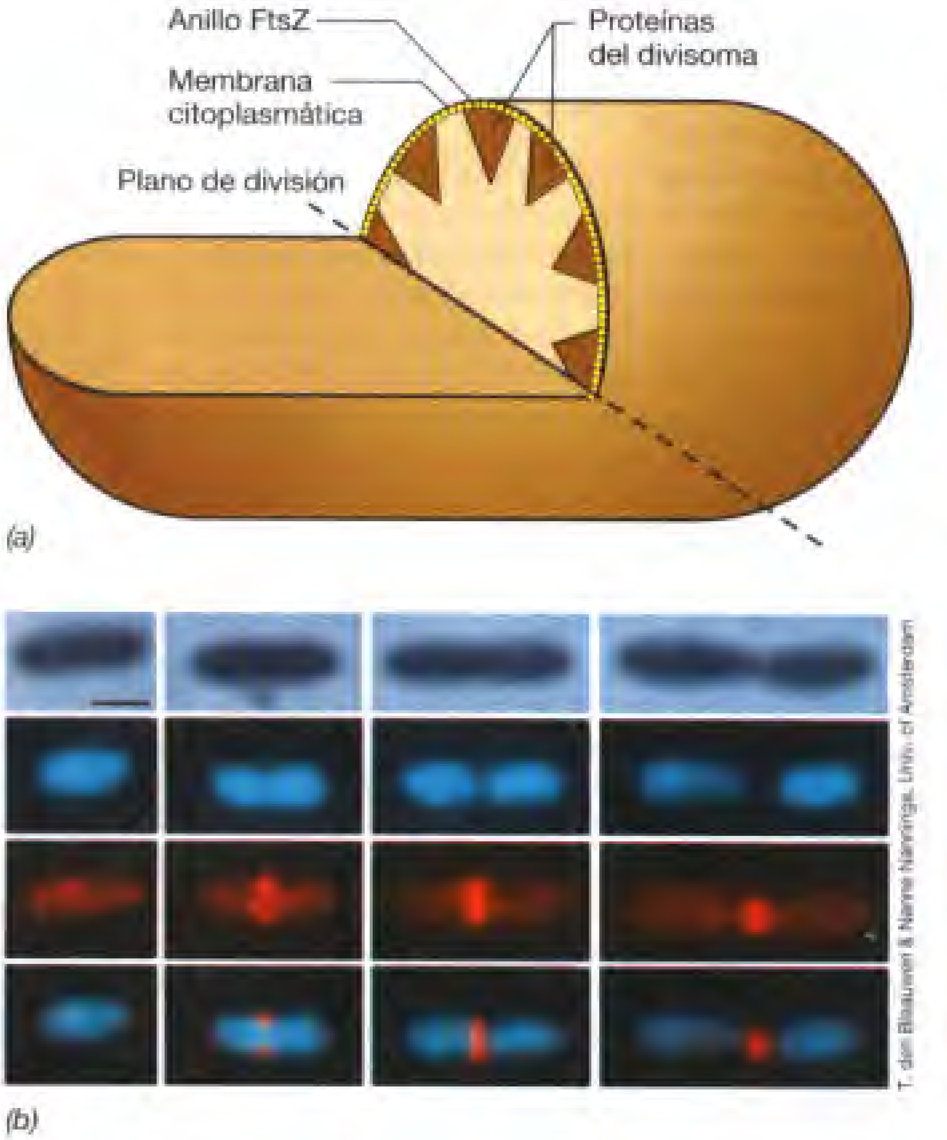
El tiempo necesario para completar un ciclo de crecimiento celular en las bacterias es muy variable y depende de varios factores, tanto nutricionales como genéticos. Bajo las mejores condiciones nutritivas, la bacteria *Escherichia coli* puede completar el ciclo en unos 20 minutos; unas cuantas bacterias pueden crecer incluso más rápidamente, pero la mayoría lo hacen más lentamente. El control de la división celular es un proceso complejo y parece estar íntimamente relacionado con sucesos que ocurren durante la replicación del cromosoma.

Proteínas Fts y el plano de la división celular

Se han identificado varias proteínas importantes en el proceso de la división celular de los procariotas. Estas proteínas son esenciales para la división celular normal y se han llamado **proteínas Fts** (del inglés «filamentous temperature sensitive», que describe las propiedades de las células con mutaciones en los genes que las codifican). En *Escherichia coli* y otras bacterias se ha estudiado con detalle una proteína clave del grupo FtsZ. Las proteínas Fts están distribuidas universalmente entre procariotas, incluyendo *Archaea*, y también se han encontrado proteínas de este tipo en las mitocondrias y cloroplastos, lo que apoya la existencia de lazos evolutivos con *Bacteria* (*véanse* Secciones 2.3 y 14.5). Resulta interesante que FtsZ muestre similitudes estructurales con la tubulina, una proteína importante en la división celular de los eucariotas (*véase* Sección 14.1).

Las proteínas Fts forman en la célula un aparato de división que se llama **divisoma**, cuya formación comienza con la unión de moléculas de FtsZ formando un anillo alrededor del cilindro celular hacia el centro de la célula (Figura 6.2). Esta área define el plano de división celular. Las moléculas de FtsZ polimerizan hasta formar un anillo continuo que luego atrae a otras proteínas FtsZ (Figura 6.2). Se piensa que el divisoma también contiene proteínas implicadas en la síntesis de peptidoglicano (*véase* Sección 6.2). Las actividades del divisoma con relación a cómo ocurre realmente la división celular es un área de investigación muy activa. El divisoma parece dirigir la síntesis de nuevos materiales de membrana y de pared celular en las dos direcciones hasta que la célula alcanza aproximadamente el doble de su longitud original; a continuación ocurre una constricción para formar las dos células hijas como se indica en la Figura 6.1.

La replicación del DNA ocurre antes de que se forme el anillo de FtsZ. El cese de la síntesis de DNA parece ser la señal para la formación del anillo, y esta estructura aparece precisamente en el espacio situado entre los dos nucleoides duplicados. La localización del punto medio real parece debida a una serie de proteínas llamadas Min, especialmente a MinE, que de algún modo interacciona con los nucleoides duplicados. En cualquier caso, a medida que progresa la elongación celular, las dos copias del cromosoma se separan y cada uno termina en una célula hija. Cuando ocurre la constricción, el anillo de FtsZ comienza a despolimerizarse y se dispara hacia el interior de esa zona la síntesis de los materiales de la pared celular que eventualmente lle-



T. den Blaauwen & Nanne Nanninga, Univ. of Amsterdam

Figura 6.2 El anillo FtsZ y la división celular. (a) Corte de un bacilo mostrando el anillo de las moléculas de FtsZ alrededor del plano de división. (b) Aparición y degradación del anillo FtsZ durante el ciclo celular de *Escherichia coli*. Microscopía: fila superior, contraste de fases; segunda fila, tinción del nucleoide; tercera fila, células teñidas con un reactivo específico para FtsZ; cuarta fila, tinción combinada del nucleoide y FtsZ. Procesos de división celular: primera columna, anillo FtsZ aún sin formar; segunda columna, aparición del anillo FtsZ cuando el nucleoide inicia la segregación; tercera columna, anillo FtsZ completo durante la elongación; cuarta columna, degradación del anillo FysZ y división celular. La barra en la foto superior izquierda, 1 μm.

gan a sellar la región de unión de una célula con otra. La proteína FtsZ tiene actividad enzimática y es capaz de hidrolizar guanosina trifosfato (GTT) liberando energía. Parece probable que esta energía sea la responsable de la polimerización y despolimerización de FtsZ, y la formación y destrucción del anillo correspondiente (Figura 6.2).

Las proteínas Fts constituyen un engranaje clave en el proceso de división celular en procariotas. Existe un gran interés en comprender la división celular bacteriana a nivel molecular, no sólo por motivos de investigación básica sino también porque tal conocimiento puede conducir al desarrollo de nuevos compuestos dirigidos a puntos específicos del proceso. Como en el caso de la penicilina, un antibiótico que interfiere la síntesis de la pared celular bacteriana (*véase* Sección 6.2), ciertos compuestos capaces de bloquear la división podrían tener efectos selectivos sobre bacterias patógenas sin afectar a los humanos o a los animales, que carecen de proteínas Fts.

Forma celular y actina en procariotas

Aunque las proteínas FtsZ tienen un papel importante en la *división*, cabe preguntarse qué factor o factores determinan la *forma* de una célula procariótica. Durante muchos años se pensó que el peptidoglicano se sintetizaba de tal modo que definía, o al menos participaba, en el establecimiento de la morfología celular. Ahora parece claro que en procariotas existen proteínas específicas implicadas en este proceso. Tales proteínas muestran una homología significativa con la proteína *actina*, componente fundamental del citoesqueleto de las células eucarióticas (*véase* Sección 14.4).

La proteína clave que determina la forma en procariotas se denomina MreB. Esta proteína forma una especie de citoesqueleto similar al de la actina en *Bacteria* y probablemente también en *Archaea*. La proteína MreB forma bandas filamentosas en espiral en el interior de la célula, debajo la membrana citoplasmática. Parece que el citoesqueleto de MreB determina de alguna manera la forma celular generando una fuerza contra la membrana citoplasmática.

Curiosamente, las bacterias con forma de coco carecen de proteínas MreB y de los genes que las codifican. Esto sugiere que «por defecto» la forma de una bacteria es la esférica y que las variaciones en la disposición de los filamentos MreB en las células no cocoides determinan la forma bacilar y otras morfologías celulares típicas de varios procariotas (*véase* Figura 4.11). Por tanto, con FtsZ y MreB, la célula procariótica posee proteínas estructuralmente similares a la tubulina y a la actina, respectivamente, que son las proteínas involucradas en la división celular y en el andamiaje interno de las células eucarióticas. Es notable observar cómo las soluciones biológicas a estos procesos clave en las células eucarióticas tiene sus raíces evolutivas en las células procarióticas.

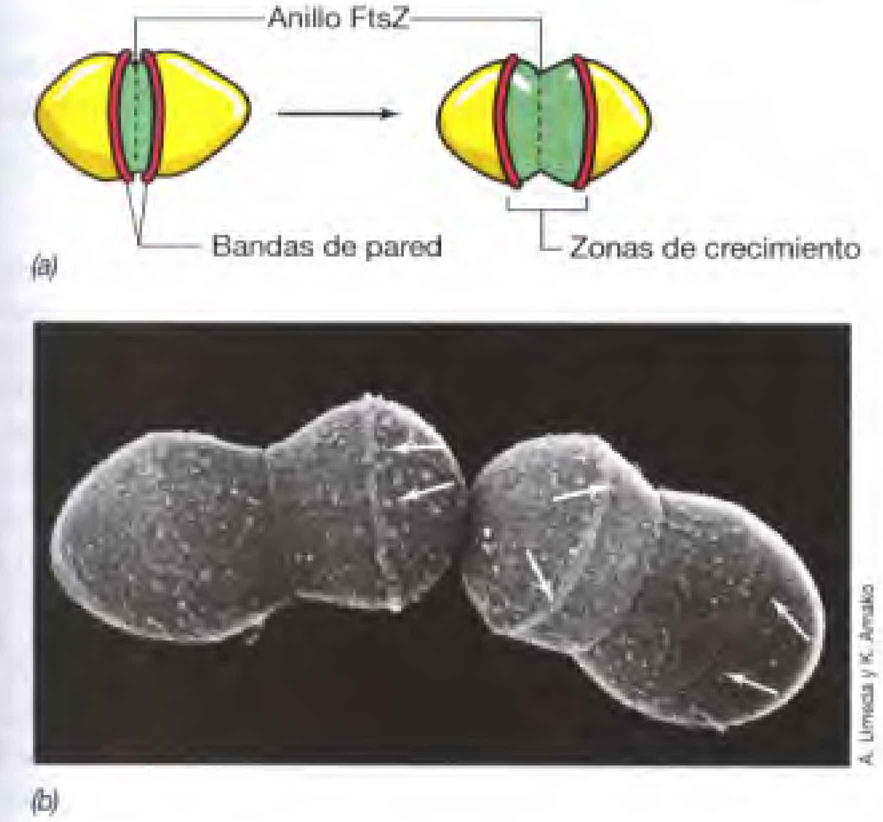
✓ 6.6 Revisión de conceptos

El crecimiento microbiano supone un incremento en el *número* de células más que en el tamaño de las células individuales. El crecimiento de la mayoría de los microorganismos ocurre por fisión binaria. La división celular y la replicación del cromosoma están reguladas de modo coordinado, y las proteínas Fts son claves en estos procesos.

- ✓ ¿Por qué es necesario que el cromosoma bacteriano se replique antes de la división binaria?
- ✓ ¿Cuál es la función de la proteína FTsZ en la división celular de los procariotas?
- ✓ ¿Cuál es la función de la proteína MreB en procariotas?

6.2 Síntesis del peptidoglicano y división celular

Cuando una célula se alarga antes de la división celular, se sintetiza una nueva pared celular. Este nuevo material debe añadirse a la pared celular preexistente sin pérdida de la integridad estructural. Este proceso ocurre como se indica en la Figura 6.3. En la zona del anillo FtsZ (Figura 6.2*a* y Figura 6.3) se abren pequeños huecos en la pared que son creados por enzimas llamadas *autolisinas*, funcionalmente similares a la lisozima y que están presentes en el divisoma



A. Umeda y K. Amako

Figura 6.3 Síntesis de la pared celular en *Bacteria* Gram positivas. (a) Localización de la síntesis de la nueva pared celular durante la división celular. En los cocos, la síntesis de la nueva pared (mostrada en verde) se localiza en un solo punto. El anillo FtsZ (*véase* Figura 6.2) define el plano de división celular. (b) Micrografía electrónica de barrido de células de *Streptococcus hemolyticus* mostrando las bandas de la pared. Cada célula tiene aproximadamente 1 μm de diámetro.

(*véase* Sección 4.8). El nuevo material se añade a través de estas aberturas (Figura 6.3*a*). La unión entre el peptidoglicano nuevo y el antiguo forma un reborde en la superficie de las bacterias Gram positivas (Figura 6.3*b*) análogo a una cicatriz. Es esencial que el nuevo peptigoglicano se incorpore dentro del preexistente *antes* de que se corten los enlaces en este último, a fin de asegurar que la presión de turgencia no haga estallar la célula por uno de los puntos de corte. Si esto no tiene lugar correctamente, puede ocurrir un proceso de lisis espontánea denominado **autolisis**.

Biosíntesis del peptidoglicano

La estructura general del peptidoglicano se presentó en el Capítulo 4 (*véase* Sección 4.8). La capa de peptidoglicano actúa como una malla anti-estrés, a modo de cubierta de un neumático. Durante el crecimiento celular la síntesis del nuevo peptidoglicano supone el corte controlado del peptidoglicano preexistente por las autolisinas y la inserción simultánea de precursores. En este proceso interviene un transportador, una molécula lipídica llamada **bactoprenol** (Figura 6.4). El bactoprenol es un alcohol muy hidrofóbico de C_{55} que se une a la unidad precursosa del peptidoglicano *N*-acetilglucosamina/*N*-acetilmurámico/ pentapéptido (Figura 6.5*a*). El bactoprenol transporta estas unidades estructurales a través de la membrana convirtiendo a los precursores en lo suficientemente hidrofóbicos como para atravesarla. Una vez en el periplasma, el bactoprenol conecta con enzimas que insertan los precursores en el punto de crecimiento de la pared celular y catalizan la formación de los enlaces glicosídicos (Figura 6.5*b*).

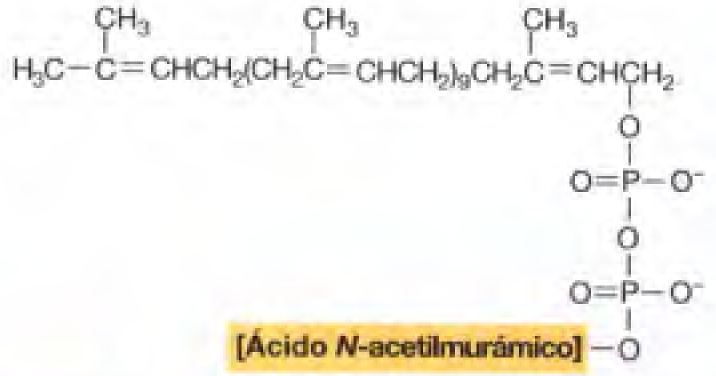

$$H_3C-\overset{CH_3}{\overset{|}{C}}=CHCH_2(CH_2\overset{CH_3}{\overset{|}{C}}=CHCH_2)_9CH_2\overset{CH_3}{\overset{|}{C}}=CHCH_2-O-\underset{O^-}{\overset{O}{P}}-O-\underset{O^-}{\overset{O}{P}}-O-[\text{Ácido } N\text{-acetilmurámico}]$$

Figura 6.4 Bactoprenol (undecaprenol fosfato), el transportador lipídico de las unidades estructurales del peptidoglicano de la pared celular.

Transpeptidación: la diana de la penicilina

El paso final de la síntesis del peptidoglicano, conocido como **transpeptidación**, es la formación de los puentes interpeptídicos entre unidades de ácido murámico de cadenas adyacentes de glicano. Desde el punto de vista médico,

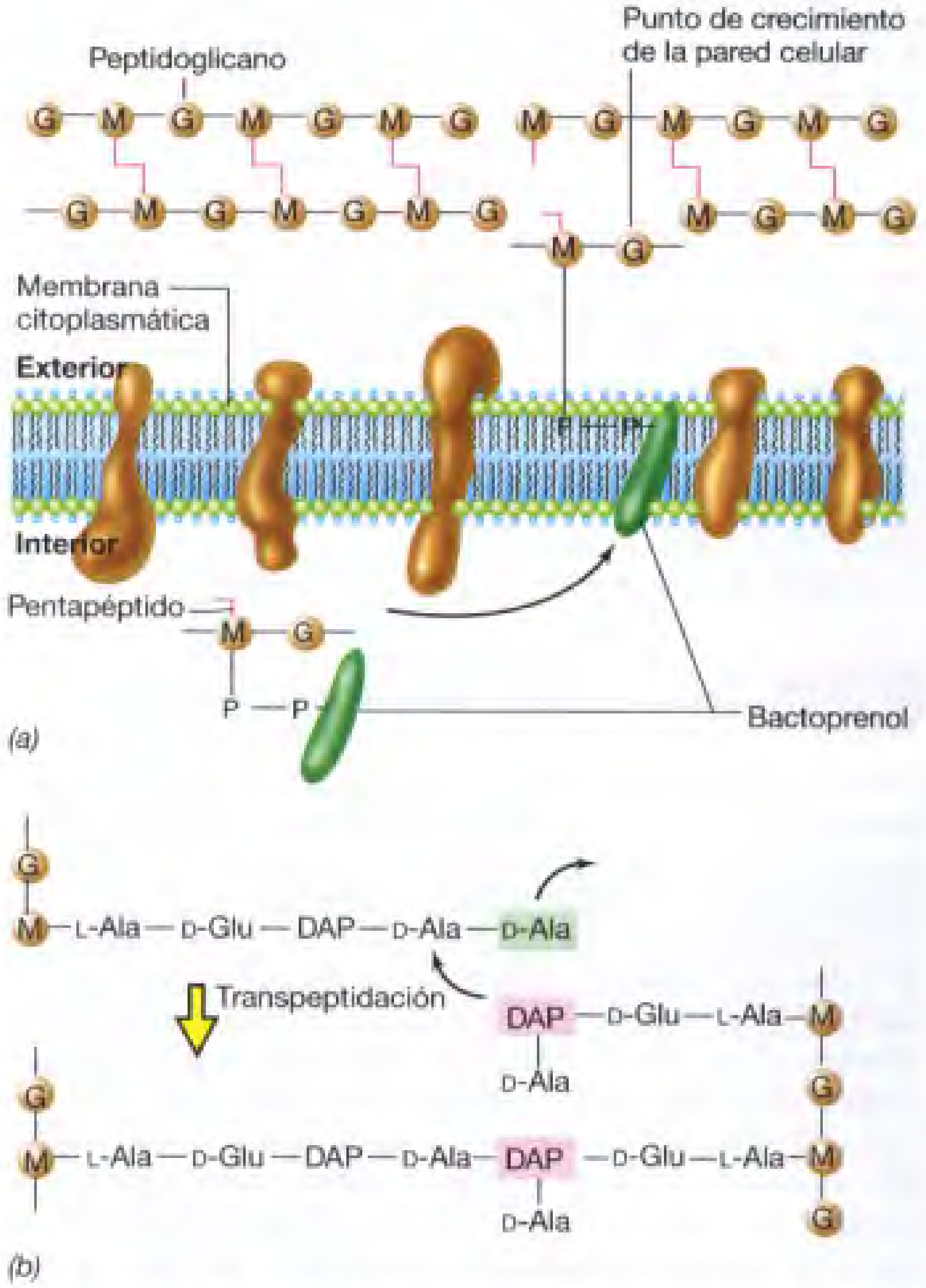


Figura 6.5 Síntesis del peptidoglicano. (a) Transporte de los precursores del peptidoglicano a través de la membrana citoplasmática hasta el punto de crecimiento de la pared celular. (b) La reacción de transpeptidación que conduce al entrecruzamiento final de dos cadenas de peptidoglicano. La penicilina inhibe esta reacción.

la transpeptidación es importante porque es la reacción inhibida por el antibiótico *penicilina*. Se han identificado en el periplasma de las especies de *Bacteria* Gram negativas varias proteínas de unión a la penicilina, al menos una de las cuales es una Fts (*véase* Sección 6.1); cuando la penicilina se une a ellas dejan de ser catalíticamente activas. En ausencia de nueva síntesis de pared por estas proteínas no funcionales, se produce la lisis celular debido a la acción continuada de las autolisinas que debilitan la pared.

La transpeptidación supone la formación de un enlace peptídico entre diferentes aminoácidos, dependiendo de la estructura de la pared celular del organismo concreto. En las especies de *Bacteria* Gram negativas, el enlace suele ser entre el ácido diaminopimélico de un péptido y la D-alanina del péptido adyacente (Figura 6.5*b*). Al final del peptidoglicano precursor hay inicialmente dos moléculas de D-alanina, pero una desaparece durante la reacción de transpeptidación suministrando la energía necesaria para hacer posible la reacción (recuérdese que la transpeptidación ocurre fuera de la membrana, donde no existe ATP disponible). En *Bacteria* Gram positivas, donde por lo general se presenta un puente interpeptídico de pentaglicina (*véanse* Sección 4.8 y Figura 4.31), el enlace ocurre a través de dicho puente, implicando a una L-lisina de un péptido y a una D-alanina del otro.

✓ 6.2 Revisión de conceptos

Durante el crecimiento celular la nueva pared se sintetiza insertando nuevas unidades de glicano en el preexistente. Un alcohol de cadena larga llamado bactoprenol facilita el transporte de las nuevas unidades a través de la membrana para incorporarse a la pared celular en crecimiento. La transpeptidación fija a los precursores en la malla de peptidoglicano.

- ✓ ¿Qué son las *autolisinas* y por qué son necesarias?
- ✓ ¿Cuál es la función del bactoprenol?
- ✓ ¿Qué es la *transpeptidación* y por qué es importante?

TUTORIA Crecimiento de poblaciones

6.3 Crecimiento de poblaciones

Como hemos dicho, el *crecimiento* se define como un aumento en el *número* de células microbianas de una población; también puede medirse como un incremento de la *masa* celular. La **velocidad de crecimiento** es el cambio en el número de células o en la masa celular experimentado *por unidad de tiempo*. Durante el ciclo de división celular, todos los componentes estructurales de la célula se duplican. El intervalo para la formación de dos células a partir de una supone una **generación**, y el tiempo transcurrido para que esto ocurra se llama **tiempo de generación** (*véase* Figura 6.1) . Por tanto, el tiempo de generación es el tiempo que se requiere para que la población se duplique, razón por la cual a veces el tiempo de generación se llama *tiempo de duplicación*. Durante cada generación, tanto el número de células como la masa celular se duplican. Los tiempos de generación varían ampliamente entre los distintos microorganismos. Muchas bacterias tienen tiempos de generación comprendidos entre 1-3 horas, pero unas cuantas crecen muy rápidamente y se dividen en tan sólo 10 minutos mientras que otras tardan varios días. Además, el tiempo de generación de un microorganismo determinado también es función del medio de cultivo utilizado y de las condiciones de incubación empleadas.

Crecimiento exponencial

En la Figura 6.6 se representa un experimento de crecimiento iniciado con una sola célula que tiene un tiempo de generación de 30 minutos. Este modelo de incremento de la población, en el que en cada periodo fijo de tiempo *se duplica* el número de células, se denomina **crecimiento exponencial**. Cuando en un sistema de coordenadas se representa aritméticamente el número de células de un experimento en función del tiempo transcurrido, se obtiene una curva cuya pendiente aumenta constantemente (Figura 6.6*b*). Sin embargo, es difícil obtener información sobre el crecimiento a partir de este tipo de curvas. Si, como en la Figura 6.6*b*, representamos el número de células en una escala logarítmica ($\log_{10}$) y el tiempo en una escala aritmética (resultando una gráfica *semilogarítmica*) obtenemos una línea recta. Esta función lineal es un indicador inmediato de que las células están creciendo exponencialmente. Además, las gráficas semilogarítmicas son adecuadas y simples de usar para determinar tiempos de generación a partir de una serie de resultados. El tiempo de generación puede deducirse directamente de este tipo de representaciones (*véanse* Figuras 6.7 y 6.12*b*).

Tiempo (h)	Número total de células	Tiempo (h)	Número total de células
0	1	4	256
0,5	2	4,5	512
1	4	5	1024
1,5	8	5,5	2048
2	16	6	4096
2,5	32	.	.
3	64	.	.
3,5	128	10	1 048 576

(a)

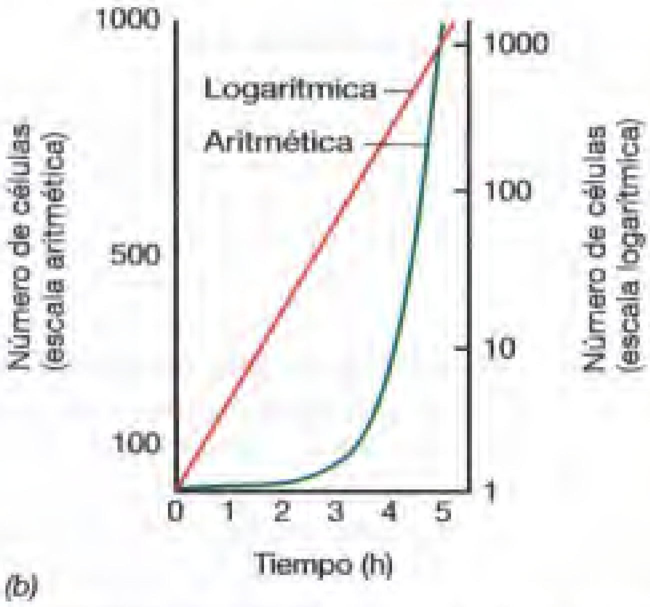


Figura 6.6 La velocidad de crecimiento de un cultivo microbiano. (a) Datos de una población que se duplica cada 30 minutos. (b) Datos representados en escala aritmética (ordenada izquierda) o en escala logarítmica (ordenada derecha).

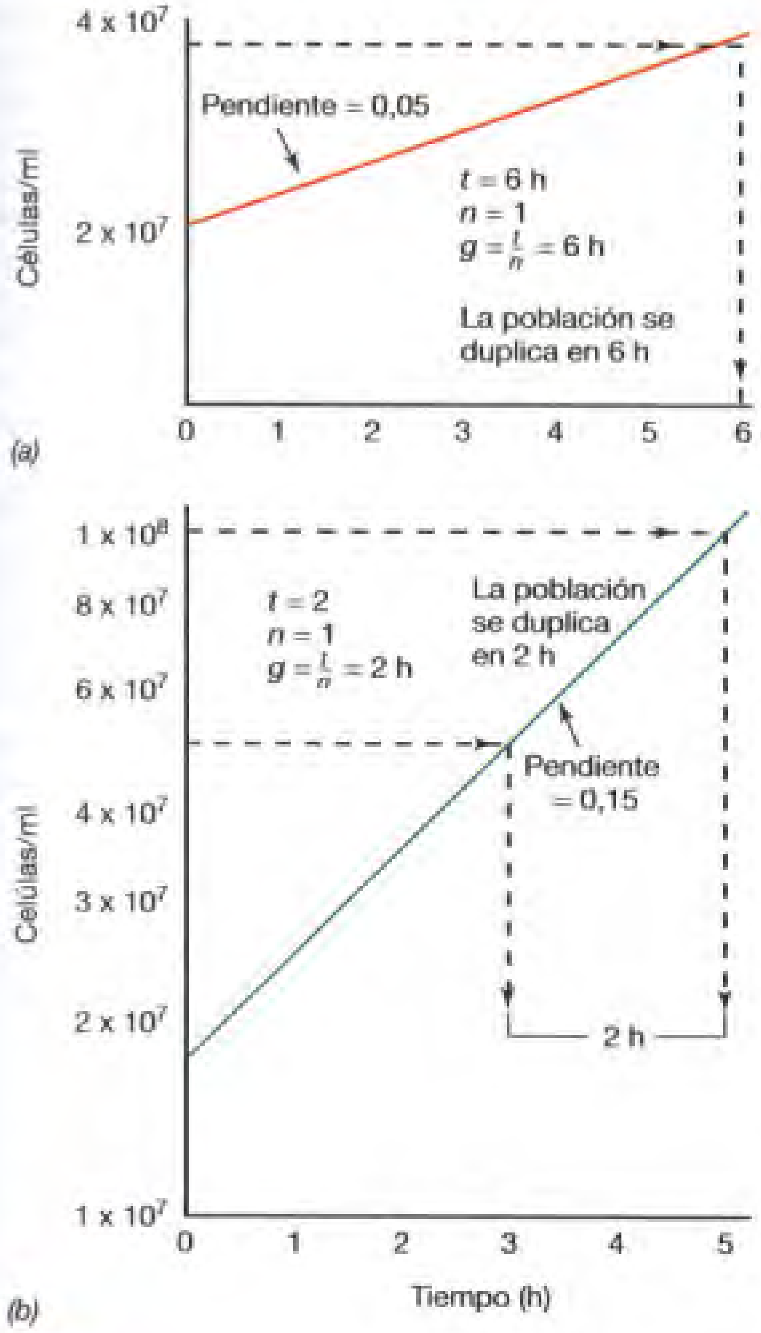


Figura 6.7 Método de determinación de los tiempos de generación (g) de poblaciones creciendo exponencialmente con tiempos de generación de (a) 6 horas y (b) 2 horas a partir de los datos representados en gráficas semilogarítmicas. La pendiente de cada línea es igual a 0,301/g y n es igual al número de generaciones que han ocurrido en el tiempo t. Todos los números están expresados en notación científica; es decir, 10.000.000 es 1×10^7; 60.000.000 es 6×10^7, etc.

Una característica del crecimiento exponencial es que la *velocidad* del aumento del número de células es inicialmente lenta pero incrementa cada vez más con el tiempo. Esto determina que en las últimas etapas el aumento del número de células sea realmente explosivo. Por ejemplo, en el experimento de la Figura 6.6, durante los primeros 30 minutos de crecimiento la *velocidad* de producción de células es de una célula cada 30 minutos. Sin embargo, entre las 4 y 4,5 horas de crecimiento, la velocidad de producción de células es considerablemente mayor, 256 células cada 30 minutos (Figura 6.6). Una consecuencia práctica del crecimiento exponencial es que cuando un producto no estéril, como la leche, se deja en condiciones que permiten el crecimiento microbiano unas cuantas horas, durante las primeras fases del crecimiento exponencial el efecto no es muy relevante, mientras que si se deja *durante el mismo tiempo* en fase exponencial tardía el resultado es desastroso para el producto.

Parámetros del crecimiento

El aumento en número de células que se produce en un cultivo bacteriano creciendo exponencialmente es una progresión geométrica de base 2. Cuando dos células se dividen se convierten en cuatro y esto se puede expresar como $2^1 \rightarrow 2^2$. Cuando cuatro células pasan a ocho, lo expresamos como $2^2 \rightarrow 2^3$, y así sucesivamente (Figura 6.6). Debido a esta progresión geométrica, existe una relación directa entre el número de células presentes inicialmente en un cultivo y el número presente tras un periodo de crecimiento exponencial:

$$N = N_0 2^n$$

donde N = número final de células, N_0 = número inicial de células y n = *número de generaciones* que han ocurrido durante el periodo de crecimiento exponencial. El tiempo de generación g, de la población celular se calcula como t/n, donde t indica simplemente las horas o minutos de crecimiento exponencial. Por tanto, sabiendo el número inicial y final de células en una población que está creciendo exponencialmente, es posible calcular n; y conociendo n y t, calcular el tiempo de generación g.

Para expresar n a partir de la ecuación $N = N_0 2^n$, se necesita hacer las siguientes transformaciones:

$$\begin{aligned} N &= N_0 2^n \\ \log N &= \log N_0 + n \log 2 \\ \log N - \log N_0 &= n \log 2 \\ n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} &= \frac{\log N - \log N_0}{0{,}301} \\ &= 3{,}3\,(\log N - \log N_0) \end{aligned}$$

Expresando n en función de términos fácilmente medibles como N y N_0, se pueden calcular los tiempos de generación. Como ejemplo para realizar estos cálculos podemos usar los datos reales de la gráfica inferior de la Figura 6.7. El tiempo de generación de 5 horas, que en este caso se determinó directamente a partir de la gráfica, se puede también calcular teniendo en cuenta que $N = 10^8$, $N_0 = 5 \times 10^7$ y $t = 2$. Por tanto,

$$n = 3{,}3\,[\log 10^8 - \log (5 \times 10^7)] = 3{,}3\,(8 - 7{,}69) = 3{,}3\,(0{,}301) = 1$$

Así, el tiempo de generación g, que definimos como t/n, será $g = t/n = 2/1 = 2$ horas. El tiempo de generación también se puede calcular a partir de la pendiente de la recta obtenida en la representación semilogarítmica del crecimiento exponencial, pues la pendiente tiene un valor de $0{,}301/g$.

Otro índice de la velocidad de crecimiento es la *constante de la velocidad de crecimiento*, abreviadamente k. La constante de la velocidad de crecimiento se expresa como $k = \frac{\ln 2}{g} = \frac{0{,}693}{g}$ y tiene unidades de hora^{-1}. Mientras que g es una medida del tiempo que tarda una población en duplicar su número de células, k es una medida del número de generaciones que ocurren por unidad de tiempo en un cultivo exponencial.

Si disponemos de los valores de n y de t, se puede calcular g y k para diferentes microorganismos creciendo bajo diferentes condiciones de cultivo. Esto resulta a veces útil para optimizar las condiciones de cultivo de un microorganismo particular y también para probar el efecto positivo o negativo de algún tratamiento sobre el cultivo bacteriano.

✓ 6.3 Revisión de conceptos

Las poblaciones microbianas muestran un modelo típico de crecimiento llamado exponencial, que se analiza mejor representando el número de células en función del tiempo en una gráfica semilogarítmica. Conociendo el número inicial y final de células y el tiempo de crecimiento exponencial se puede calcular directamente el tiempo de generación de la población celular.

- ✓ Diferencie entre los términos *velocidad de crecimiento* y *tiempo de generación*.
- ✓ ¿Por qué el crecimiento exponencial origina grandes poblaciones celulares en cortos periodos de tiempo?
- ✓ ¿Qué es una representación *semilogarítmica*?

6.4 Curva de crecimiento

Los datos presentados en la Figura 6.6 reflejan sólo parte del ciclo de crecimiento de una población microbiana, la fase llamada de *crecimiento exponencial*. En un *sistema cerrado o cultivo en medio no renovado*, también conocido como *cultivo monofásico*, se obtiene una *curva de crecimiento* típica como la que se indica en la Figura 6.8. Esta curva de crecimiento puede dividirse en distintas fases llamadas **fase de latencia**, **fase exponencial**, **fase estacionaria** y **fase de muerte**.

Fase de latencia

Cuando se inocula una población microbiana en un medio fresco, por lo general el crecimiento no comienza inmediatamente sino sólo tras un periodo de tiempo que constituye la *fase de latencia*, la cual puede ser breve o larga dependiendo de la procedencia del cultivo y de las condiciones de crecimiento. Si un cultivo exponencial se inocula en el mismo medio y en las mismas condiciones de cultivo, no se observa un retraso y el crecimiento exponencial se inicia inmediatamente. Sin embargo, si el inóculo se toma de un cultivo viejo (fase estacionaria) y se inocula en el mismo medio, se observa normalmente un retraso aunque todas las células del inóculo sean *viables*, es decir, sean capaces de reproducirse. Esto se debe con frecuencia a que las células carecen de varios componentes esenciales para dividirse y se requiere tiempo para su síntesis. También se aprecia un retraso cuando las células del inóculo han sido dañadas parcialmente con calor, radiaciones o compuestos tóxicos, debido al tiempo requerido para recuperarse y reparar los daños.

La fase de latencia también ocurre cuando se transfiere una población de un medio rico a otro medio más pobre. Para que ocurra crecimiento en un medio de cultivo particular, las células deben tener un equipo enzimático completo que permita la síntesis de los metabolitos esenciales ausentes en el medio. Al pasar a otro medio, se necesita tiempo para la síntesis de las nuevas enzimas.

Fase exponencial

La *fase exponencial* de crecimiento ya ha sido comentada. Es una consecuencia del hecho de que cada célula se divide para formar dos, cada una de las cuales va a formar otras dos, y así sucesivamente. En general, las células en crecimiento exponencial están en el estado fisiológico más sano y, por ello, las células tomadas en el punto medio del crecimiento exponencial son a menudo las más indicadas para estudios enzimáticos y estructurales.

La mayoría de los microorganismos unicelulares crecen exponencialmente pero las velocidades del crecimiento exponencial son muy variables. La velocidad de crecimiento está influenciada por las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio de cultivo, etc.) así como

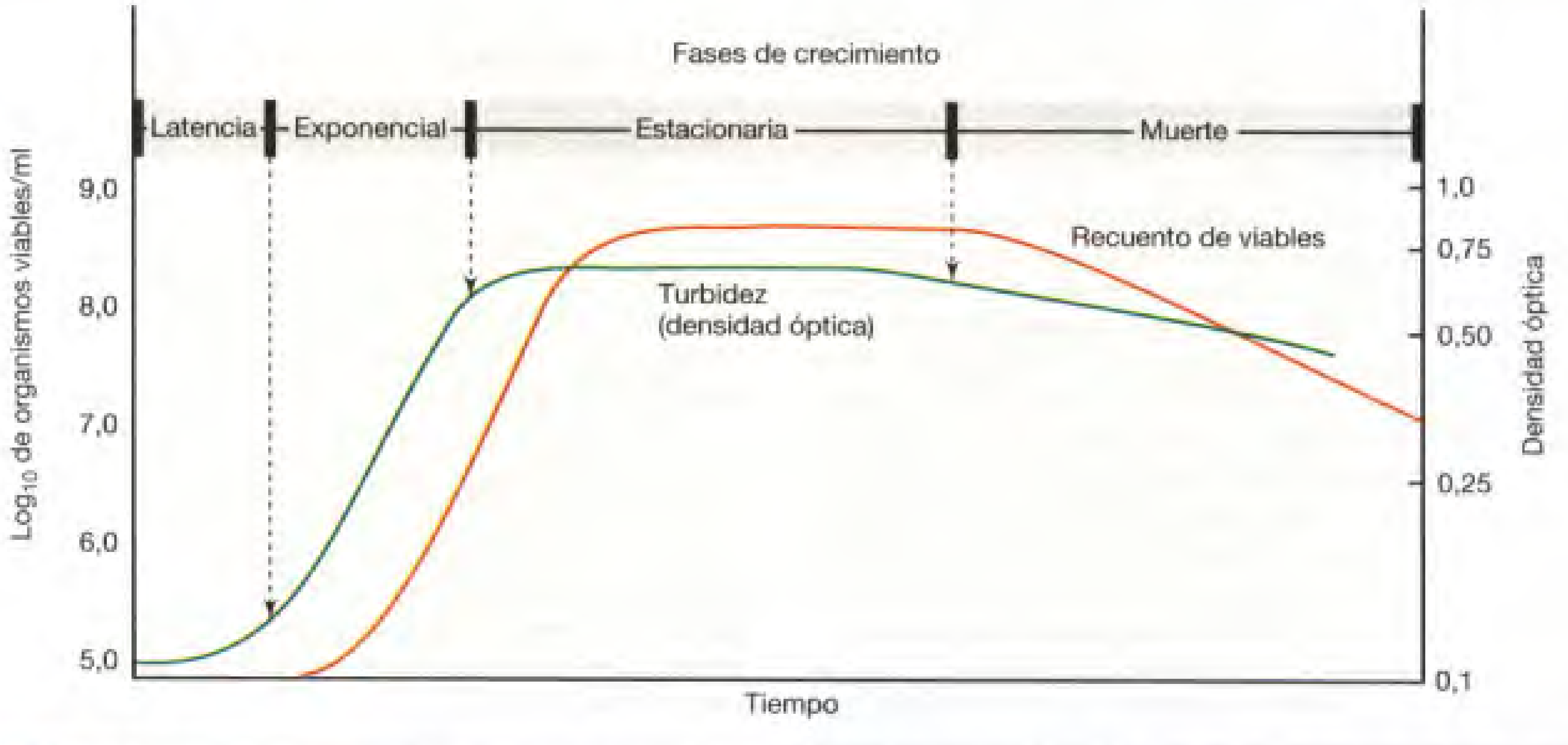


Figura 6.8 Curva de crecimiento típica de una población bacteriana. *Véanse* Secciones 6.5 y 6.6 para una descripción de los métodos de recuento celular empleados.

por las características genéticas del organismo. Por lo general, los microorganismos procarióticos crecen más rápido que los eucarióticos; y los eucariotas de pequeño tamaño lo hacen más rápido que los de mayor tamaño.

Fase estacionaria

En un sistema de cultivo cerrado, en medio o renovado o monofásico, como por ejemplo un tubo o un matraz, el crecimiento exponencial no se puede prolongar de modo indefinido. Se puede calcular que una sola bacteria con un tiempo de generación de 20 minutos produciría en tan sólo 48 horas de crecimiento exponencial continuado una población que pesaría unas 4.000 veces el peso de la Tierra. Esto resulta impresionante porque una sola célula bacteriana pesa alrededor de 10^{-12} gramos (*véase* Tabla 3.2). Es obvio que algo debe pasar mucho antes de ese tiempo que limite el crecimiento de la población. Lo que generalmente sucede es que (1) un nutriente esencial del medio de cultivo se usa y llega a ser un factor limitante del crecimiento; o bien (2) se acumulan en el medio algunos productos de desecho hasta niveles inhibitorios que hacen que cese el crecimiento exponencial. Frecuentemente ocurren ambas cosas. Al producirse esto, la población alcanza la **fase estacionaria**.

En la fase estacionaria no hay aumento ni descenso neto en el número de células. Aunque no suele haber crecimiento en la fase estacionaria muchas funciones celulares continúan, como el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos. En algunos casos puede ocurrir un lento crecimiento durante la fase estacionaria; algunas células de la población crecen, pero otras mueren y los dos procesos se equilibran de modo que no hay aumento ni disminución en el número de células (este fenómeno se llama *crecimiento críptico*).

Fase de muerte

Si la incubación continúa después de que la población haya alcanzado la fase estacionaria, las células pueden continuar vivas y metabólicamente activas, pero también pueden morir. Si ocurre esto último, se dice que la población está en **fase de muerte.** En algunos casos la muerte se acompaña de una lisis celular real. La Figura 6.8 indica que la fase de muerte de la curva de crecimiento también es exponencial; no obstante, en la mayoría de los casos la velocidad de muerte celular es mucho más lenta que la de crecimiento exponencial.

En resumen, insistimos en que las fases de la curva de crecimiento mostradas en la Figura 6.8 corresponden a sucesos que ocurren en una *población* de células, no en células individuales. Los téminos de *fase de latencia*, *fase exponencial*, *fase estacionaria* y *fase de muerte* no se aplican a las células aisladas sino a poblaciones de células.

Ahora nos centraremos en los métodos para determinar el número de células en los cultivos microbianos.

✓ 6.4 *Revisión de conceptos*

Cuando se inoculan en un medio de cultivo fresco, los microorganismos muestran una curva de crecimiento característica. Normalmente hay una fase de latencia, y luego una fase exponencial. Cuando se agotan los nutrientes esenciales o se acumulan productos tóxicos, cesa el crecimiento y la población entra en fase estacionaria. Si la incubación continúa, las células pueden empezar a morir.

- ✓ ¿En qué fase de la curva de crecimiento se dividen las células?
- ✓ ¿Cuándo *no* ocurre la fase de latencia?
- ✓ ¿Por qué entran las células en la fase estacionaria?

6.5 Medidas directas del crecimiento microbiano: recuento de células totales y viables

El crecimiento de poblaciones se mide estimando los cambios en el número de células, en la cantidad de algún componente de las mismas (por ejemplo, proteína) o en el peso total seco de las células. Existen varios métodos de contar el número de células o de determinar la masa celular, adecuados para diferentes organismos o diferentes situaciones.

Recuento de células totales

El número de células de una población se puede determinar contando una muestra con el microscopio mediante el método de **recuento directo.** El recuento directo se puede hacer de dos formas, en muestras secas sobre porta o en muestras líquidas. Con muestras líquidas se emplean *cámaras de recuento* especiales que, en esencia, son portas excavados modificados, sobre cuya superficie de vidrio está marcada una rejilla con pequeños cuadrados de área conocida (Figura 6.9). Cada cuadrado de la parrilla puede contener un pequeño volumen conocido, muy pequeño pero determinado con precisión. En el microscopio se puede contar el número de células por cada unidad de área de la parrilla, lo que permite conocer el número de células por el volumen que determina cada área. La conversión de ese valor a número de células por mililitro de la suspensión original se hace fácilmente multiplicando por un factor de conversión que depende del volumen del tipo de cámara (Figura 6.9).

El recuento directo por microscopía es un método rápido para conocer el número de células. Sin embargo, presenta ciertas limitaciones: (1) no distingue las células vivas de las muertas; (2) las células pequeñas son difíciles de ver con el microscopio y algunas posiblemente se pierden en el recuento; (3) en ocasiones la precisión es difícil; (4) se requiere un microscopio de contraste de fases cuando las muestras no se tiñen; (5) el método no suele ser adecuado para suspensiones con baja densidad celular. Si una suspensión tiene menos de 10^6 células bacterianas por mililitro es posible que no se vean bacterias en el campo del microscopio. No obstante las suspensiones diluidas se pueden contar con más fiabilidad estadística si la muestra se concentra primero y se resuspende luego en un pequeño volumen; (6) las células móviles se deben inmovilizar antes del recuento.

Recuento de células viables

En el recuento microscópico directo se cuentan tanto células vivas como muertas. En muchos casos interesa contar sólo las células vivas, y con este fin se han desarrollado métodos de recuento de células **viables**. Una célula viable se define como aquella que es capaz de dividirse y dar lugar

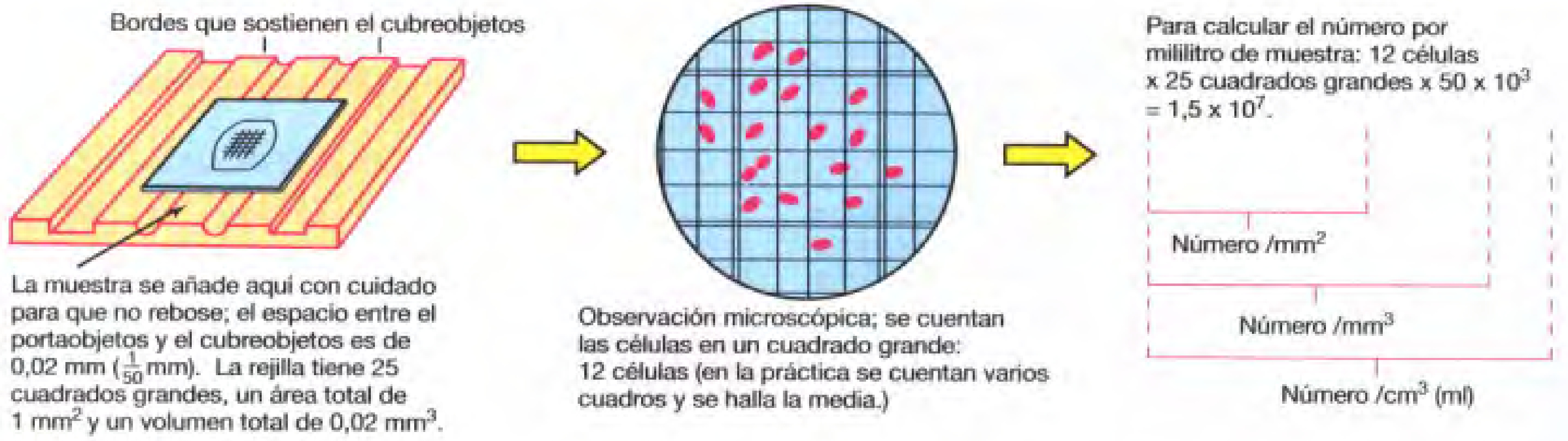

Bordes que sostienen el cubreobjetos
La muestra se añade aquí con cuidado para que no rebose; el espacio entre el portaobjetos y el cubreobjetos es de 0,02 mm ($\frac{1}{50}$ mm). La rejilla tiene 25 cuadrados grandes, un área total de 1 mm^2 y un volumen total de 0,02 mm^3.
Observación microscópica; se cuentan las células en un cuadrado grande: 12 células (en la práctica se cuentan varios cuadros y se halla la media.)
Para calcular el número por mililitro de muestra: 12 células x 25 cuadrados grandes x 50 x 10^3 = 1,5 x 10^7.
Número /mm^2
Número /mm^3
Número /cm^3 (ml)

Figura 6.9 Procedimiento de recuento microscópico directo utilizando una cámara de tipo Petroff-Hausser.

a una descendencia; y el método usual para realizar una determinación de células viables se basa en contar el número de células de la muestra que es capaz de formar colonias sobre un medio sólido adecuado. Por esta razón, el recuento de células viables también se llama **recuento en placa** o **recuento de colonias**. En este procedimiento se supone que *cada célula viable puede formar una colonia*.

Hay dos maneras de realizar un recuento en placa para viables: el método de extensión en placa y el método de vertido en placa (Figura 6.10). En el **método de extensión en placa** un cierto volumen de cultivo diluido, que no suele ser superior a 0,1 ml, se extiende sobre la superficie de una placa con medio sólido utilizando un asa estéril de extensión. La placa se incuba después hasta que aparecen las colonias y se cuenta su número. Es importante que la superficie del medio esté seca de modo que el líquido de la muestra se absorba. No se suelen usar volúmenes mayores de 0,1 ml porque el exceso de líquido no se absorbe, y origina problemas en el recuento al favorecer la extensión y mezcla de las colonias. En el **método del vertido en placa** (Figura 6.10) se pipetea un volumen conocido (normalmente 0,1-1,0 ml) de cultivo en una placa Petri estéril sobre la que se añade el medio con agar fundido y se mezcla todo bien con suaves movimientos de la placa sobre la superficie de la mesa antes de dejar que se solidifique. Como la muestra se mezcla con el medio fundido, se pueden usar volúmes de inóculo mayores que en el método de recuento por extensión; sin embargo, con este método el organismo que se cuenta debe ser capaz de resistir la temperatura del agar fundido a 45ºC.

Dilución de las suspensiones celulares antes de la siembra en placa

En los dos métodos señalados anteriormente es importante que el número de colonias que aparezcan en las placas no sea demasiado grande, pues algunas colonias se podrían fusionar dando estimaciones erróneas. También es importante que el número de colonias no sea demasiado bajo para

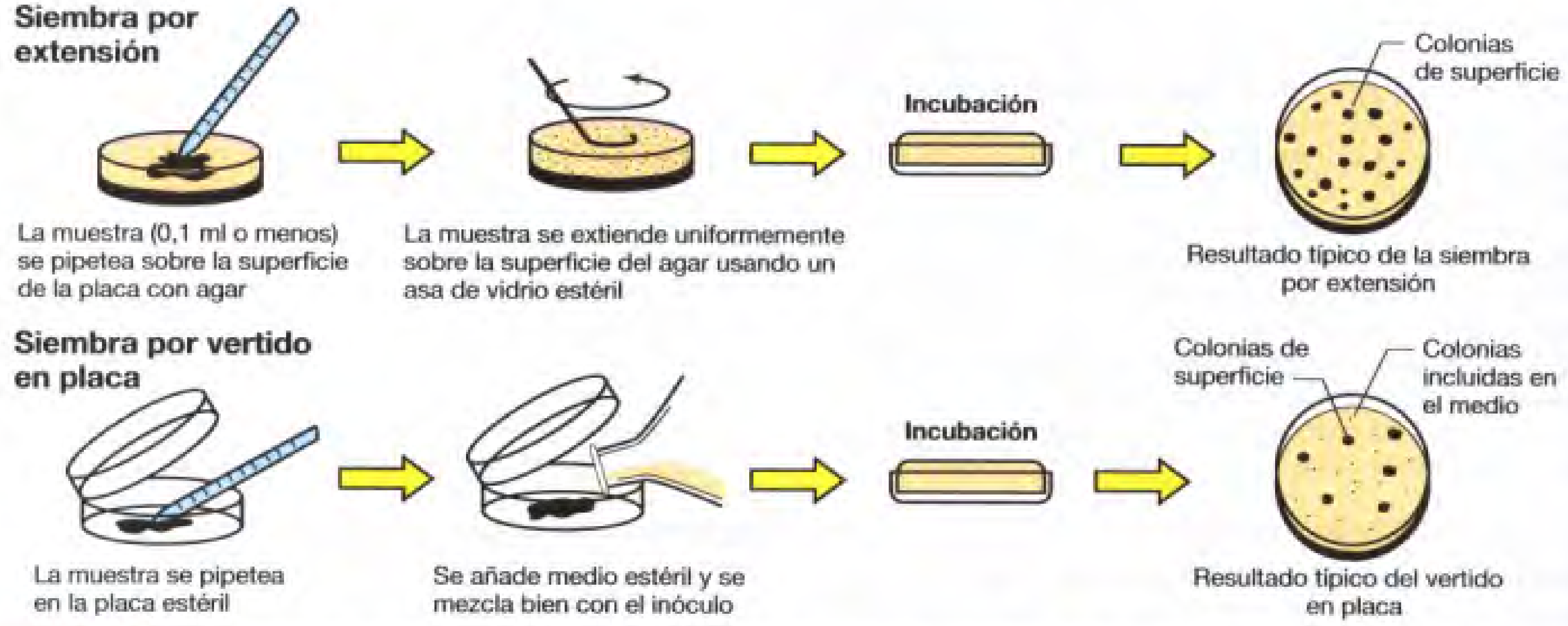

Siembra por extensión
La muestra (0,1 ml o menos) se pipetea sobre la superficie de la placa con agar
La muestra se extiende uniformemente sobre la superficie del agar usando un asa de vidrio estéril
Incubación
Colonias de superficie
Resultado típico de la siembra por extensión
Siembra por vertido en placa
La muestra se pipetea en la placa estéril
Se añade medio estéril y se mezcla bien con el inóculo
Incubación
Colonias de superficie
Colonias incluidas en el medio
Resultado típico del vertido en placa

Figura 6.10 Dos métodos de realizar una determinación de células viables (recuento en placa). En cada caso la muestra se diluye normalmente antes de sembrar.

que el cálculo sea estadísticamente significativo. En la práctica, el número de colonias por placa oscila entre 30 y 300.

Para obtener el número apropiado de colonias casi siempre se *diluye* la muestra. Como raramente se sabe de antemano el número de células viables, normalmente se hace más de una dilución. Lo más frecuente es realizar diluciones decimales de la muestra (Figura 6.11). Para hacer una dilución de 10^{-1} se mezclan 0,5 ml de la muestra con 4,5 ml de diluyente o 1 ml de la muestra con 9 ml del diluyente. Si se necesita una dilución de 10^{-2}, se pueden mezclar 0,05 ml de la muestra con 4,95 ml de diluyente o 0,1 ml con 9,9 ml. Por otra parte, una dilución 10^{-2} se puede hacer de modo seriado haciendo sucesivamente dos diluciones de tipo 10^{-1}. En la mayor parte de los casos se realizan dichas *diluciones seriadas* para alcanzar la dilución final deseada. Así, si se requiere una dilución 10^{-6} se puede lograr haciendo tres diluciones sucesivas de 10^{-2} o seis sucesivas de 10^{-1} (Figura 6.11).

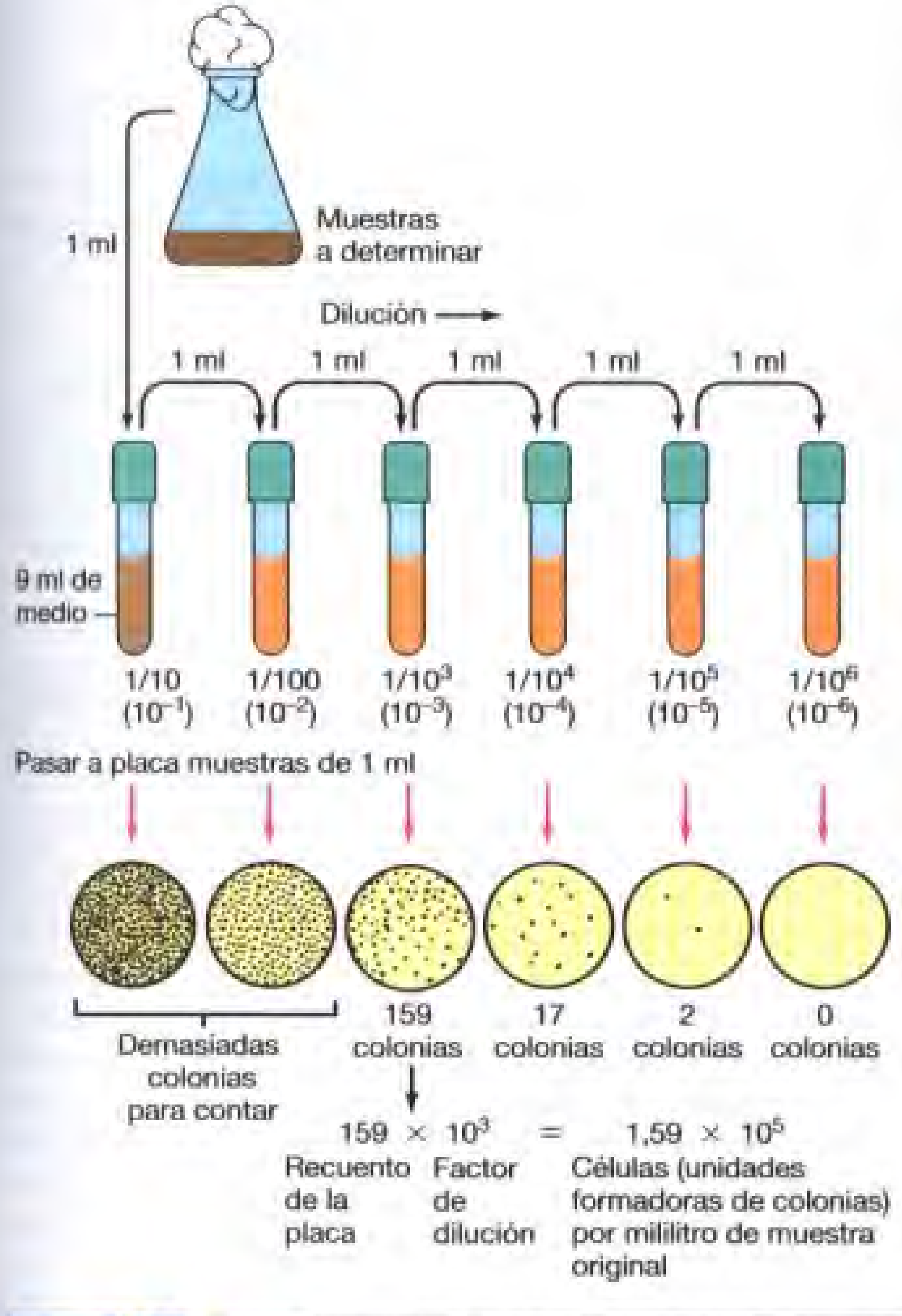


Figura 6.11 Procedimiento para la determinación de viables usando diluciones seriadas de la muestra y el método del vertido en placa. El líquido estéril usado para hacer las diluciones puede ser simplemente agua, pero una solución salina equilibrada o medio de cultivo suele dar mejor recuperación. El factor de dilución es el inverso de la dilución. En el caso de siembra por extensión (Figura 6.10) pueden ser necesarias más diluciones para extender muestras de 0,1 ml.

Fuentes de error en el recuento en placa

El número de colonias que se obtiene en una determinación de viables no sólo depende del tamaño del inóculo sino también de lo adecuado que sea el medio de cultivo y de las condiciones de incubación, así como de la duración de la incubación. Las células depositadas en la placa no se desarrollarán todas en colonias a la misma velocidad y si se emplea un corto tiempo de incubación, se obtendrán menos colonias de las posibles. Además, el tamaño de las colonias varía y si se desarrollan colonias muy pequeñas pueden pasar desapercibidas en el recuento. Es habitual establecer las condiciones de incubación (medio, temperatura y tiempo) que permitan obtener el mayor número de colonias para un determinado organismo y usar luego estas mismas condiciones. La determinación de viables puede estar sujeta a grandes errores y, si se desean recuentos precisos, han de hacerse con cuidado y hacer las placas de las diluciones por duplicado. Hay que advertir que una agrupación de dos o más células sólo producirá una colonia, de modo que el recuento de viables será erróneamente menor. El recuento de viables se expresa a menudo como *unidades formadoras de colonias* obtenidas, más que como número de *células viables* (ya que una unidad formadora de colonias pudo originarse a partir de una o más células iniciales).

Pese a estas dificultades, el recuento de viables suministra una buena información sobre el número de células viables y este procedimiento se usa ampliamente. En la alimentación, industria láctea, medicina y microbiología acuática, el recuento de viables se emplea rutinariamente. El método tiene la ventaja de una elevada sensibilidad: se pueden contar muestras con pocas células, lo que permite una detección muy sensible de la contaminación microbiana de productos o materiales. Además, el uso de medios selectivos y de ciertas condiciones de cultivo (*véase* Sección 24.2) permite contar, mediante la determinación de viables, tipos celulares particulares en una población mixta de microorganismos.

La gran anomalía del recuento en placa

Aunque es una técnica muy sensible, el recuento en placa puede ser irrealizable cuando se trata del recuento de muestras naturales, tales como suelo o agua. Por tanto, el recuento directo en muestras naturales suele dar un número mucho mayor de organismos que los que se obtienen en cultivo en placas de *cualquier* tipo de medio de cultivo (*véanse* Secciones 18.3 y 18.4). Algunos microbiólogos se refieren a este hecho como «la gran anomalía del recuento en placa». ¿Por qué los recuentos en placa dan menores números de células que los recuentos directos al microscopio? Esto se debe a una combinación de factores, como el hecho de que los métodos microscópicos cuentan células muertas, mientras que los métodos de viables no; y al hecho de que diferentes organismos, incluso en una muestra muy pequeña, pueden tener requerimientos nutricionales y de cultivo muy diversos (*véanse* Capítulos 5, 17, 18 y 19). Por tanto, aunque los recuentos en placa específicos con medios altamente selectivos, como en el análisis microbiano de aguas residuales o de alimentos, puede dar resultados fiables (*véanse* Secciones 28.1 y 29.1), «los recuentos del número total de células» de los mismos hábitat pueden ser, y habitualmente son, subestimados en varios órdenes de magnitud.

✓ 6.5 Revisión de conceptos

El crecimiento se mide por el cambio en el número de células a lo largo del tiempo. El recuento de células al microscopio mide el número total de células de la población, mientras que el recuento de viables (recuento de colonias) mide sólo la población viva.

- ✓ ¿Por qué un *recuento de viables* es más sensible que un *recuento microscópico*?
- ✓ ¿Qué suposición se hace al relacionar el recuento en placa con el número de células?
- ✓ Describa cómo obtendría una dilución 10^{-7} de un cultivo bacteriano.
- ✓ ¿Qué es la «gran anomalía» del recuentro en placa?

6.6 Medidas indirectas del crecimiento microbiano: turbidez

Un método muy rápido y útil de obtener estimaciones del número de células son las *medidas de turbidez*. Una suspensión celular aparece turbia a la vista porque las células dispersan la luz que atraviesa la suspensión. Cuantas más células estén presentes mayor será la luz dispersada y, por tanto, mayor la turbidez. La turbidez puede medirse con aparatos como el *fotómetro* o *espectrofotómetro* que hacen pasar la luz a través de suspensiones celulares y detectan la cantidad de luz emergente no dispersada (Figura 6.12). La principal diferencia entre estos dos instrumentos es que un fotómetro emplea un filtro simple para generar luz incidente de longitud de onda relativamente corta, mientras que un espectrofotómetro emplea un prisma o red de difracción para generar luz incidente en una banda muy estrecha de longitudes de onda (Figura 6.12*a*). Las longitudes de onda más comúnmente usadas para medir la turbidez bacteriana son 540 nm (verde), 600 nm (naranja) y 660 nm (rojo). Sin embargo, tanto los fotómetros (nefelómetros) como los espectrofotómetros miden solamente luz no dispersada y las lecturas se expresan en unidades fotométricas (por ejemplo, «unidades Klett» para el fotómetro Klett-Summerson) (*véase* Figura 6.12*b*) o en unidades de densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro.

Obtención de una curva estándar

En el caso de organismos unicelulares, las unidades fotométricas o de densidad óptica son proporcionales (dentro de ciertos límites) al número de células; por consiguiente, las lecturas de turbidez pueden usarse como un sustituto de los métodos de recuento directo. Sin embargo, antes de utilizar la turbidez como sistema para estimar el número de células, se debe preparar primero para cada microorganismo a estudiar una curva estándar relacionando alguna medida directa del número de células (microscópica o recuento de viables) o de la masa (peso seco) con la medida *indirecta* obtenida por turbidez (Figura 6.12*c*). Tal curva de calibración puede contener datos tanto del número de células como de la masa celular, permitiendo una estimación de ambos parámetros a partir de una simple lectura de la turbidez (Figura 6.12*c*).

A altas concentraciones celulares, la luz dispersada por una célula, que normalmente no alcanzaría el detector, puede ser redispersada por otra de tal modo que para la célula fotoeléctrica es como si no hubiese sido dispersada nunca. Cuando esto ocurre, la correspondencia entre el número de células y la turbidez pierde linearidad (Figura 6.12*c*). Sin embargo, en unos límites, las medidas de turbidez pueden ser razonablemente precisas y tienen la virtud de ser rápidas y fáciles de realizar. Además estas determinaciones se pueden hacer normalmente sin destruir o modificar significativamente la muestra. Por estos motivos, las medidas de la turbidez se usan con frecuencia para seguir la velocidad de crecimiento en los cultivos microbianos; la misma muestra puede medirse repetidamente, los resultados se pueden representar semilogarítmicamente frente al tiempo (Figura 6.12*b*) y usarse para calcular el tiempo de generación de un cultivo en crecimiento.

✓ 6.6 Revisión de conceptos

Las medidas de la turbidez son un método indirecto muy útil y rápido de medir el crecimiento bacteriano. Sin embargo, para relacionar un recuento de células directo con un valor de la turbidez, se requiere establecer primero una curva estándar de calibración.

- ✓ Cite dos ventajas del uso de la turbidez para medir el crecimiento celular.
- ✓ Describa cómo usaría un valor de la turbidez para deducir cuántas colonias obtendría al sembrar en placa un cultivo de una DO determinada.

6.7 Cultivo continuo: el quimiostato

Hasta ahora nos hemos referido al crecimiento microbiano en cultivos en sistemas cerrados o en **medio no renovado**, es decir, cuando el crecimiento ocurre en un volumen fijo de medio de cultivo que está siendo continuamente modificado por la acción de los microorganismos que crecen hasta que ya no es adecuado para permitir más crecimiento. En los cultivos en medio no renovado o sistemas cerrados, las condiciones pueden ser relativamente constantes al principio de la fase exponencial de crecimiento, pero después, cuando el número de células llega a ser muy elevado, ocurren cambios drásticos en la composición química del medio. En muchos estudios, sin embargo, es deseable que los cultivos se mantengan en un ambiente constante durante largos periodos de tiempo, y esto puede lograrse empleando *cultivos continuos*. Un cultivo continuo es un sistema abierto, con volumen constante, al que se añade continuamente medio fresco y del que se retira continuamente medio (usado) con células a una velocidad constante (cultivo en medio renovado). Una vez que se alcanza el equilibrio en el sistema, el número de células y el estado metabólico permanecen *constantes* y se dice entonces que el sistema está en **estado de equilibrio**.

El quimiostato

El tipo más común de aparato que se utiliza para obtener un cultivo continuo es el **quimiostato** (Figura 6.13), que controla tanto la densidad de la población celular como la velocidad de crecimiento del cultivo. Para lograr este control en un quimiostato son importantes dos factores, la *velocidad de dilución* y la *concentración de un nutriente que actúa como*

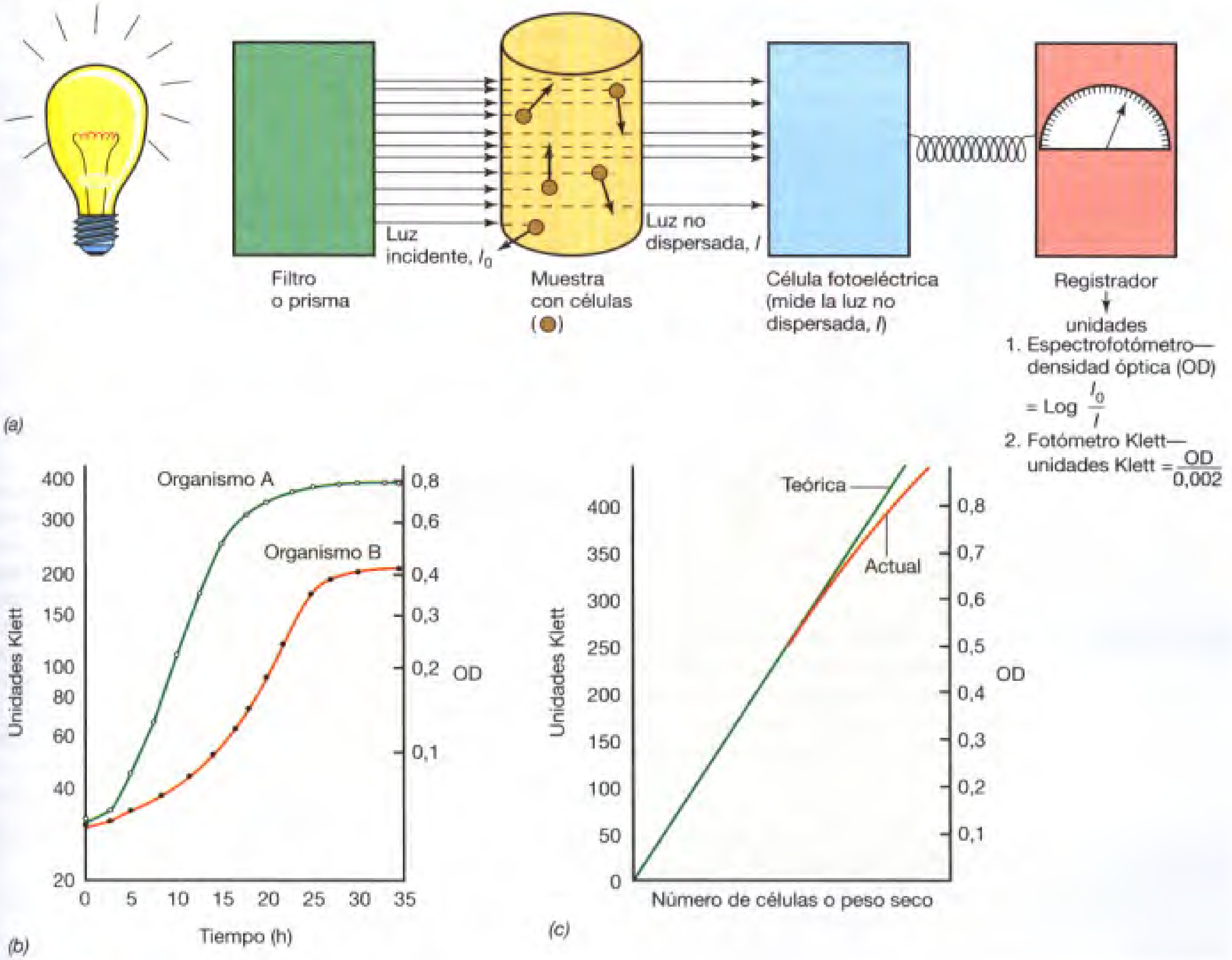

Filtro
o prisma
Luz
incidente, I_0
Muestra
con células
(●)
Luz no
dispersada, I
Célula fotoeléctrica
(mide la luz no
dispersada, I)
Registrador
unidades
1. Espectrofotómetro—
densidad óptica (OD)
$= \text{Log}\ \frac{I_0}{I}$
2. Fotómetro Klett—
unidades Klett $= \frac{\text{OD}}{0{,}002}$
(a)
Organismo A
Organismo B
Unidades Klett
400
300
200
150
100
80
60
40
20
0,8
0,6
0,4
0,3
0,2
0,1
OD
0
5
10
15
20
25
30
35
Tiempo (h)
(b)
Teórica
Actual
Unidades Klett
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
OD
Número de células o peso seco
(c)

Figura 6.12 Medidas turbidimétricas del crecimiento microbiano. (a) Las medidas de turbidez se realizan en un espectrofotómetro o un fotómetro. La célula fotoeléctrica mide la luz incidente no dispersada por las células en suspensión y da lecturas de densidad óptica o unidades fotométricas. (b) Curva de crecimiento típica representada con datos en unidades Klett para dos organismos que crecen con velocidades diferentes. Para practicar, calcule el tiempo de generación (g) de los dos cultivos usando la fórmula $n = (\log N - \log N_0)/0{,}301$, donde N y N_0 son dos valores diferentes de unidades Klett tomados en un intervalo de tiempo t. ¿Qué organismo crece más rápido, A o B? (c) Relación entre el número de células o peso seco y sus lecturas turbidimétricas. Nótese que la equivalencia se pierde a valores altos de turbidez.

factor limitante, tal como la fuente de carbono o de nitrógeno. En un cultivo cerrado, la concentración de nutrientes afecta a la velocidad de crecimiento y a la producción de microorganismo, (Figura 6.14). A concentraciones muy bajas de un nutriente determinado, la velocidad de crecimiento disminuye debido probablemente a que el nutriente no se transporta al interior de la célula lo suficientemente rápido como para satisfacer la demanda metabólica, mientras que a concentraciones moderadas o altas de ese mismo nutriente, la *velocidad* de crecimiento no se verá afectada y la *producción* de células aumentará (Figura 6.14). A diferencia de esto, en un quimiostato la velocidad de crecimiento y la producción de células pueden controlarse *independientemente una de otra*; la primera ajustando la velocidad de dilución y la segunda variando la concentración de un nutriente que actúa como factor limitante.

En la Figura 6.15 se representan los efectos que se producen al variar la velocidad de dilución y la concentración del nutriente limitante. Como puede verse, los límites en los que la velocidad de dilución controla la velocidad de crecimiento son muy amplios, aunque a valores extremos el equilibrio se rompe. A velocidades de dilución muy altas, el organismo no puede crecer lo suficientemente rápido como para evitar su dilución, y el cultivo desaparece por «lavado» del quimiostato. Por el contrario, a velocidades de dilución muy bajas, una gran parte de la población celular puede morir porque el nutriente limitante no llega a ser suministrado a la velocidad adecuada como para permitir el mantenimiento del metabolismo celular.

En el quimiostato, la *densidad celular* (células/ml) se controla por el nivel del nutriente que actúa como factor limitante, de igual manera que se controla la biomasa celu-

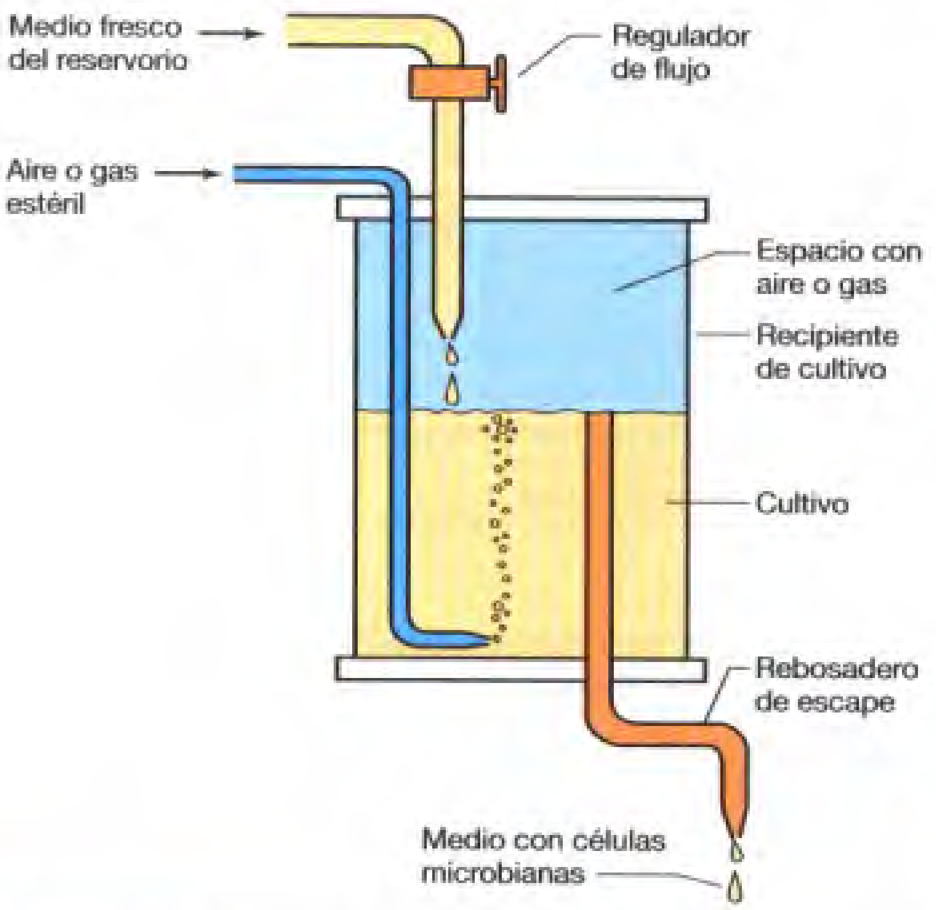


Figura 6.13 Esquema de un aparato de cultivo continuo (quimiostato). En este dispositivo la densidad de población se controla por la concentración del nutriente limitante presente en el reservorio, y la velocidad de crecimiento se controla por la velocidad de flujo o salida (véase Figura 6.15). Ambos parámetros pueden fijarse por el experimentador.

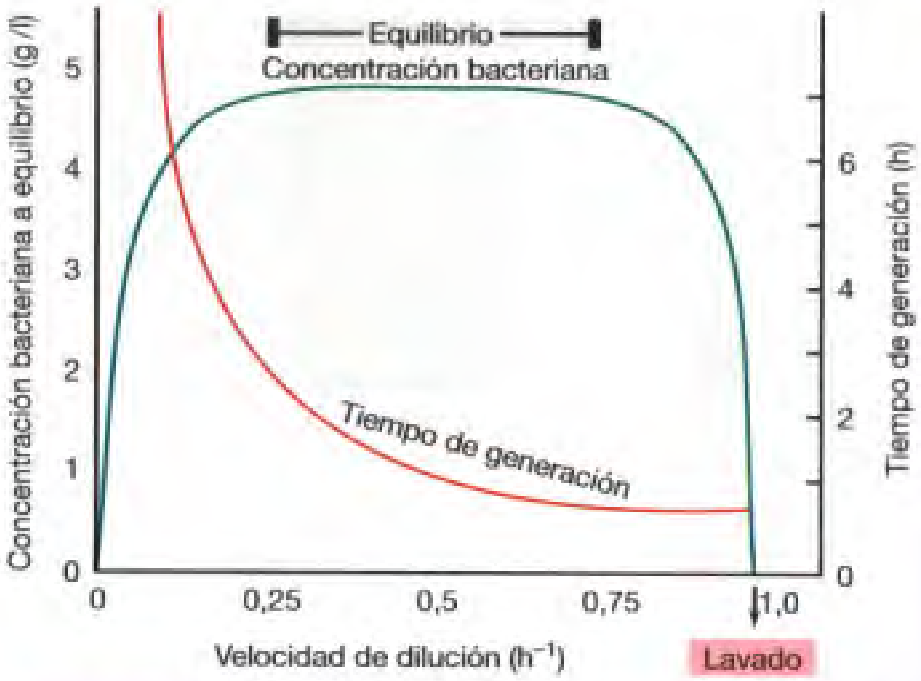


Figura 6.15 Relaciones en un quimiostato en estado de equilibrio. La velocidad de dilución viene determinada por la velocidad de flujo o de salida y por el volumen del recipiente del cultivo. Así, con un recipiente de 1 000 ml y una velocidad de flujo de 500 ml/h la velocidad de dilución será de 0,5 h^{-1}. Nótese que a velocidades de dilución altas, el crecimiento no puede equilibrar a la dilución y la población resulta «lavada» del cultivo. Nótese igualmente que aunque la densidad de población permanece constante en equilibrio, la velocidad de crecimiento (y el tiempo de generación) puede variar ampliamente. Por tanto, el experimentador puede obtener poblaciones con velocidades variables de crecimiento sin afectar a la densidad de población celular.

lar en un cultivo cerrado (Figura 6.14). Si se eleva la concentración de este nutriente en el medio entrante, manteniendo constante la velocidad de dilución, la densidad celular aumentará. Por tanto, manipulando la velocidad de dilución y el nivel de nutrientes, el experimentador puede obtener —a voluntad— una gran variedad de densidades de población celular creciendo a distintas velocidades de crecimiento.

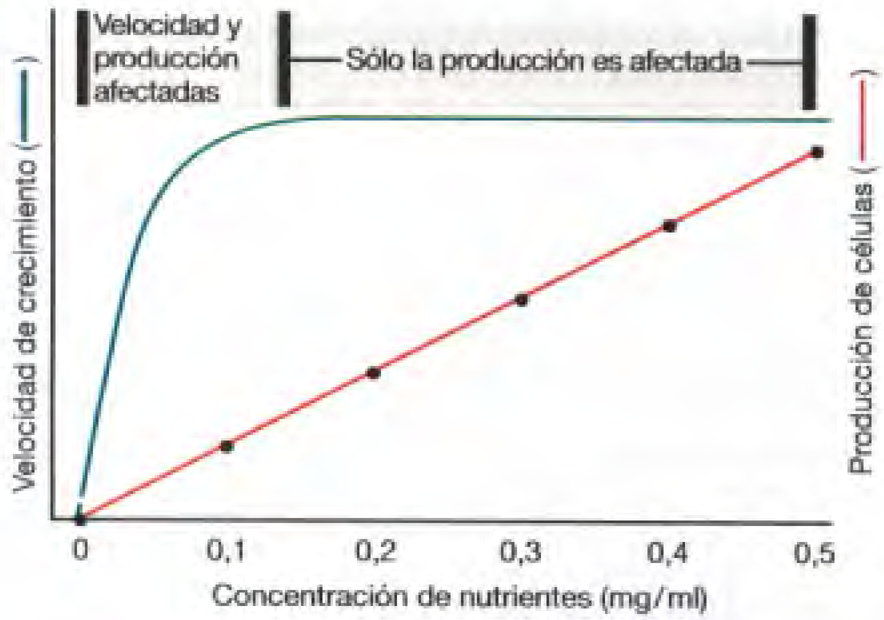


Figura 6.14 Relación entre la concentración de nutrientes, velocidad de crecimiento (línea continua) y producción de células (línea discontinua) en un sistema cerrado o cultivo en «batch». A baja concentración de nutrientes tanto la velocidad de crecimiento como la producción se ven afectadas.

Usos experimentales del quimiostato

Una de las mayores ventajas de este instrumento es que permite al experimentador controlar la velocidad de crecimiento y la densidad de población de *modo independiente*. Como se muestra en la Figura 6.15, con márgenes bastantes amplios, en el quimiostato se puede obtener cualquier velocidad de crecimiento deseada simplemente variando la velocidad de dilución. Análogamente, la densidad de la población puede definirse variando la concentración de un único nutriente (el factor limitante) en el recipiente de medio. En los cultivos monofásicos, el control independiente de estos dos parámetros críticos del crecimiento resulta imposible porque son *sistemas cerrados* desde el punto de vista de la adición de nutrientes y de la eliminación de productos, y por tanto las condiciones varían constantemente con el tiempo.

Una ventaja práctica del quimiostato es que permite mantener una población en fase exponencial de crecimiento durante mucho tiempo, días e incluso semanas. Como las células en fase exponencial de crecimiento suelen ser las más adecuadas para experimentos fisiológicos, mediante el quimiostato se puede disponer de tales células en cualquier momento. Así los experimentos se pueden planear con detalle y luego realizarlos cuando sea más conveniente. Además, los experimentos se pueden repetir sabiendo que la población celular es prácticamente la misma cada vez.

El quimiostato también es muy útil en estudios de ecología microbiana. Por ejemplo, como el quimiostato puede simular las bajas concentraciones de sustrato que ocurren a menudo en la naturaleza, es posible el estudio en un quimiostato de poblaciones bacterianas mixtas para determinar cuestiones de competitividad de un organismo sobre otro a concentraciones particulares de nutrientes. Utilizando métodos de cultivo clásicos, así como técnicas de ecología molecular (*véase* Capítulo 18), se pueden ir estudiando los cambios en la comunidad microbiana en función de las condiciones del quimiostato. A menudo, estos experimentos revelan interacciones entre componentes de la población que no resultan evidentes mediante estudios de crecimiento en cultivos cerrados. Los quimiostatos también se usan para el aislamiento y enriquecimiento de bacterias (*véanse* Secciones 1.5 y 18.1). A partir de un inóculo mixto, se puede seleccionar una población estable bajo determinadas condiciones de nutrientes y velocidad de dilución, y luego ir encrementando la velocidad de dilución hasta que sólo quede un tipo de microorganismo. De este modo, se ha conseguido aislar recientemente una bacteria con un tiempo de generación de 6 minutos, que es la bacteria de crecimiento más rápida que se conoce.

✓ 6.7 Revisión de conceptos

Los sistemas de cultivo continuo o en medio renovado (quimiostatos) permiten mantener poblaciones de células en crecimiento exponencial durante largos periodos de tiempo. En un quimiostato, la velocidad de dilución del cultivo determina la velocidad de crecimiento mientras que el tamaño de la población está determinado por la concentración de nutriente limitante que entra en el recipiente.

✓ ¿En qué se diferencian los microorganismos de un *quimiostato* de los procedentes de un cultivo en un *sistema cerrado o en medio no renovado*?

✓ Explique lo que ocurre en un quimiostato si la velocidad de dilución supera la velocidad de crecimiento de un organismo.

✓ ¿Se tienen que usar cultivos puros en un quimiostato?

II EFECTOS AMBIENTALES SOBRE EL CRECIMIENTO MICROBIANO

Hasta ahora hemos descrito el crecimiento de los microorganismos considerando esencialmente las condiciones ideales del laboratorio. Sin embargo, las actividades de los microorganismos se ven muy afectadas por las condiciones químicas y físicas del medio. El conocimiento de los efectos ambientales nos permite explicar la distribución de los microorganismos en la naturaleza y hace posible diseñar métodos que controlen o potencien las actividades microbianas. A este respecto se pueden considerar muchos factores ambientales, pero hay *cuatro* factores que tienen una función destacada en el control del crecimiento microbiano: la temperatura, el pH, la disponibilidad de agua y el oxígeno. Consideraremos cada uno de estos factores con detalle.

6.8 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento

La temperatura es uno de los factores más importantes que afectan al crecimiento y a la supervivencia de los microorganismos. A temperaturas muy frías o muy calientes los microorganismos no crecerán. Pero los valores absolutos de estas temperaturas mínimas o máximas varían mucho entre microorganismos diferentes y, por lo general, reflejan el rango de temperatura media de sus hábitat naturales. A continuación, examinaremos el efecto de la temperatura sobre el crecimiento microbiano.

Temperaturas cardinales

La temperatura ejerce dos tipos de efectos opuestos sobre los organismos vivos. A medida que se eleva la temperatura, las reacciones químicas y enzimáticas de la célula son más rápidas y el crecimiento se acelera. Sin embargo, por *encima* de una cierta temperatura algunas proteínas particulares pueden sufrir daños irreversibles. En consecuencia, dentro de un cierto margen, un aumento de temperatura supone un incremento en el crecimiento y en el metabolismo hasta un punto en que tienen lugar las reacciones de inactivación. Por encima de tal punto, las reacciones celulares caen rápidamente a cero. Así, para cada organismo existe una temperatura *mínima* por debajo de la cual no es posible el crecimiento, una temperatura *óptima* a la que se produce el crecimiento más rápido, y una temperatura *máxima* por encima de la cual no es posible el crecimiento (Figura 6.16). La temperatura óptima está siempre más cerca de la máxima que de la mínima. Estas tres temperaturas, que se llaman **temperaturas cardinales o fundamentales**, generalmente son características de cada tipo de organismo, pero no son completamente fijas, pues pueden ser ligeramente modificadas por otros factores del ambiente, en particular por la composición del medio.

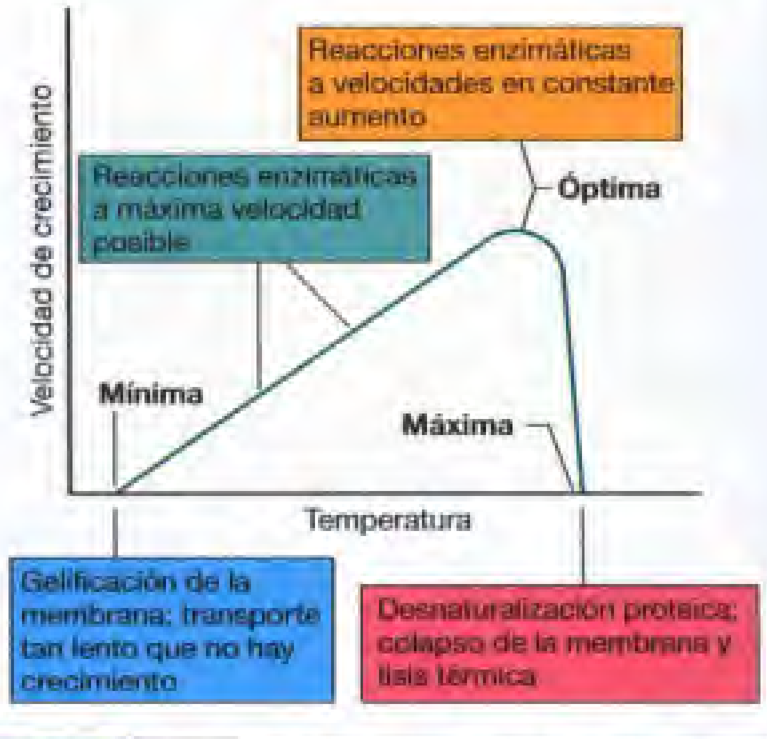


Figura 6.16 Efecto de la temperatura sobre la velocidad de crecimiento y consecuencias moleculares para la célula. Las tres temperaturas cardinales varían para cada organismo.

La temperatura máxima de crecimiento de un organismo determinado refleja probablemente la inactivación de una o más proteínas en la célula. Sin embargo, los factores que determinan la temperatura *mínima* de crecimiento de un organismo no son tan claros. Como se mencionó antes (*véase* Sección 4.5) la membrana citoplasmática debe estar en un estado fluido para su correcto funcionamiento y tal vez la temperatura mínima de crecimiento sea resultado de la «congelación» de esas funciones de la membrana en cuanto al transporte de nutrientes o a la formación del gradiente de protones. Esta interpretación está respaldada por experimentos en los que la temperatura mínima de un organismo puede alterarse en alguna medida variando la composición lipídica de la membrana (*véase* Sección 6.9). Las temperaturas cardinales o fundamentales de diferentes microorganismos difieren mucho entre sí; algunos muestran temperaturas óptimas tan bajas como 4°C y otros tan altas como más de 100°C. El rango de temperaturas en el que ocurre crecimiento es incluso más amplio que este margen, desde temperaturas por debajo del punto de congelación hasta temperaturas superiores a las de ebullición (¡la arquea *Pyrolobus fumarii* tiene una temperatura máxima de 113°C!). No obstante, no hay ningún microorganismo que tenga todo este intervalo de temperaturas que, para el caso de un organismo determinado, suele ser de unos 30°C, aunque algunos presentan márgenes de temperatura más amplios que otros.

Clases de microorganismos según la temperatura

Aunque existe todo un espectro continuo entre los microorganimos, desde los que tienen su temperatura óptima a temperaturas muy bajas hasta los que la tienen a temperatura alta, se pueden distinguir *cuatro grupos* de microorganismos con relación a su temperatura óptima: **psicrófilos**, con temperaturas óptimas bajas; **mesófilos**, con temperaturas óptimas moderadas; **termófilos**, con altas temperaturas óptimas; e **hipertermófilos**, con temperaturas óptimas muy elevadas (Figura 6.17). Los mesófilos se encuentran en animales de sangre caliente y en medios acuáticos y terrestres de latitudes templadas y tropicales. Los psicrófilos y los termófilos se encuentran en ambientes muy fríos o calientes, respectivamente. Los hipertermófilos son típicos de ambientes concretos extremadamente calientes como fuentes termales, géisers y fuentes hidrotermales submarinas (*véanse* Secciones 6.10 y 19.8).

En *Escherichia coli*, un típico mesófilo, se ha estudiado con detalle el crecimiento en función de la temperatura y se han definido con precisión las temperaturas cardinales o fundamentales. La temperatura óptima de *E. coli* en un medio complejo es 39°C, la máxima 48°C y la mínima 8°C. Estos valores son susceptibles de pequeñas variaciones debidas a diferentes cepas y, en general, las temperaturas máxima y mínima suelen ser respectivamente mayores y menores cuando se usan medios complejos en vez de medios definidos.

✓ 6.8 Revisión de conceptos

La temperatura es un factor ambiental importante en el control del crecimiento microbiano. Las temperaturas cardinales o fundamentales definen las temperaturas mínima, óptima y máxima a las que crece cada organismo. Los microorganismos pueden agruparse según los márgenes de temperatura que requieren.

- ✓ ¿Cuáles son las temperaturas cardinales aproximadas de *Escherichia coli*? ¿A qué clase pertenece por su temperatura óptima?
- ✓ ¿En qué se diferencia un *hipertermófilo* de un *psicrófilo*?
- ✓ *Escherichia coli* puede crecer a temperatura más alta en medio complejo que en medio definido. ¿Por qué?

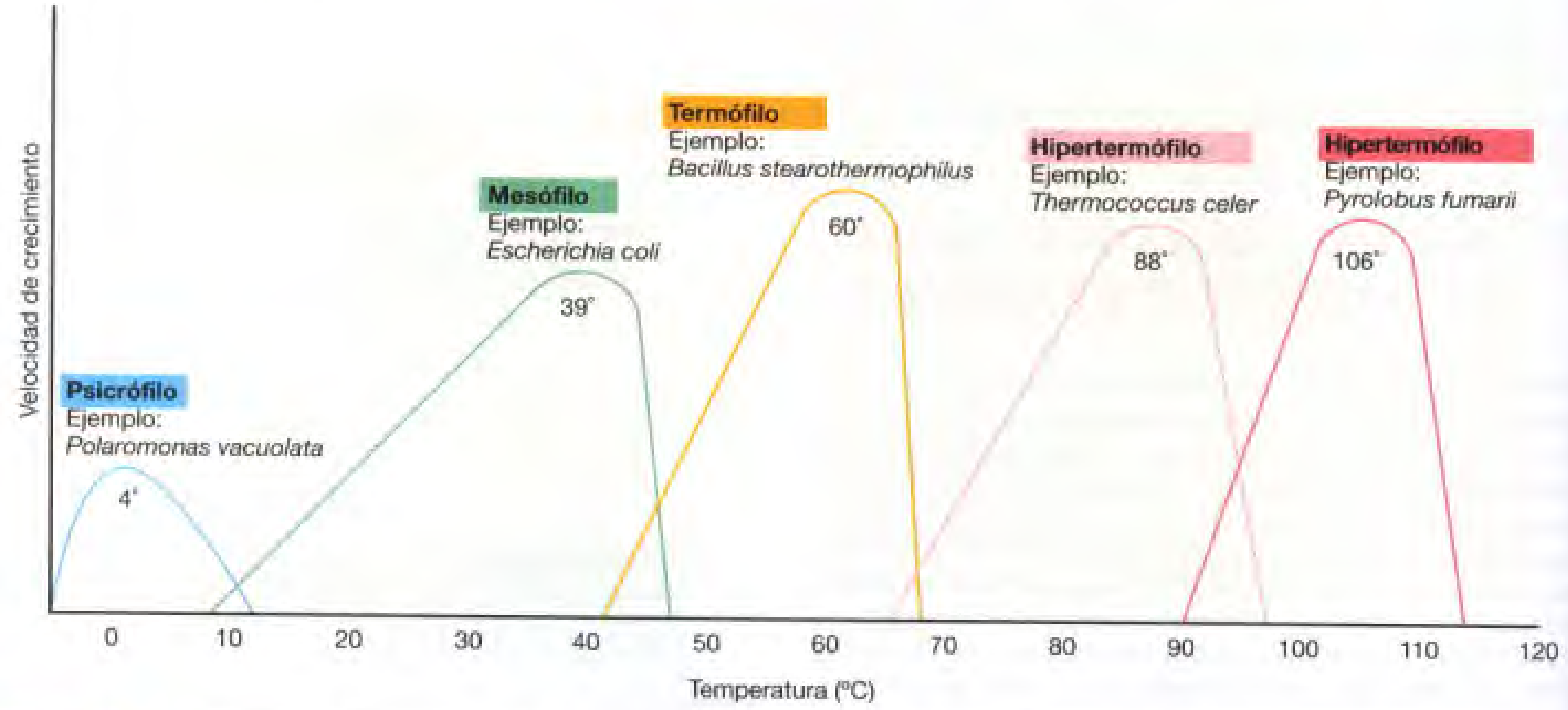


Figura 6.17 Relación entre la temperatura y las velocidades de crecimiento de psicrófilos, mesófilos, termófilos y dos hipertermófilos diferentes. En cada caso, se indican las temperaturas óptimas de microorganismos representativos.

6.9 Crecimiento microbiano a bajas temperaturas

Como los seres humanos vivimos y trabajamos en la superficie de nuestro planeta en lugares donde las temperaturas son generalmente moderadas, consideramos que los ambientes muy calientes y muy fríos son «extremos». Son extremos para los humanos porque morirían rápidamente si se les metiera en agua hirviendo o en agua congelada. Sin embargo, los hábitat normales de muchos microorganismos pueden ser extremadamente calientes o extremadamente fríos. Tales microorganismos se conocen como **extremófilos** (*véanse* Sección 2.4 y Tabla 2.1) y han evolucionado hasta crecer de modo óptimo en esas condiciones. Aquí consideraremos organismos que crecen a bajas temperaturas.

Ambientes fríos

Gran parte de la superficie terrestre experimenta bajas temperaturas. Los océanos, que representan más de la mitad de la superficie terrestre, tienen una temperatura media de 5°C y las profundidades marinas tienen temperaturas constantes de 1-3°C. En el Ártico y en el Antártico hay vastas áreas permanentemente congeladas, o que se descongelan sólo algunas semanas al año (Figura 6.18*a*). Estos ambientes fríos raramente son estériles y se encuentran microorganismos vivos creciendo a cualquier temperatura baja en la que aún exista agua líquida. Incluso en muchos materiales congelados existen normalmente pequeñas zonas microscópicas con agua líquida donde los microorganismos pueden metabolizar y crecer. Es importante distinguir entre los ambientes que son fríos *a lo largo* del año y aquellos que son fríos *solamente* en el invierno. Los últimos son característicos de climas continentales templados y pueden tener temperaturas estivales tan altas como 40°C y temperaturas invernales de −20°C o más frías. Tales ambientes altamente variables son mucho menos favorables para los organismos adaptados al frío que los ambientes que están constantemente fríos, como los que se encuentran en las regiones polares, a elevadas alturas, o en las profundidades oceánicas.

Microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes

Como ya se indicó, los organismos con temperatura óptima baja se llaman **psicrófilos**. Un psicrófilo puede definirse como un organismo que tiene una temperatura óptima de crecimiento de 15°C o inferior, una temperatura máxima de crecimiento por debajo de 20°C y una temperatura mínima de crecimiento de 0°C o más baja. Los organismos que crecen a 0°C pero tienen temperaturas óptimas de 20-40°C se llaman **psicrotolerantes**.

Los psicrófilos se encuentran en ambientes permanentemente fríos, como en las regiones polares y sus sedimentos marinos, y mueren rápidamente si se exponen a temperatura ambiente normal. Por esta razón, su estudio en laboratorio requiere un gran cuidado para estar seguros de que nunca se calientan durante el muestreo, el transporte al laboratorio, el aislamiento y otras manipulaciones.

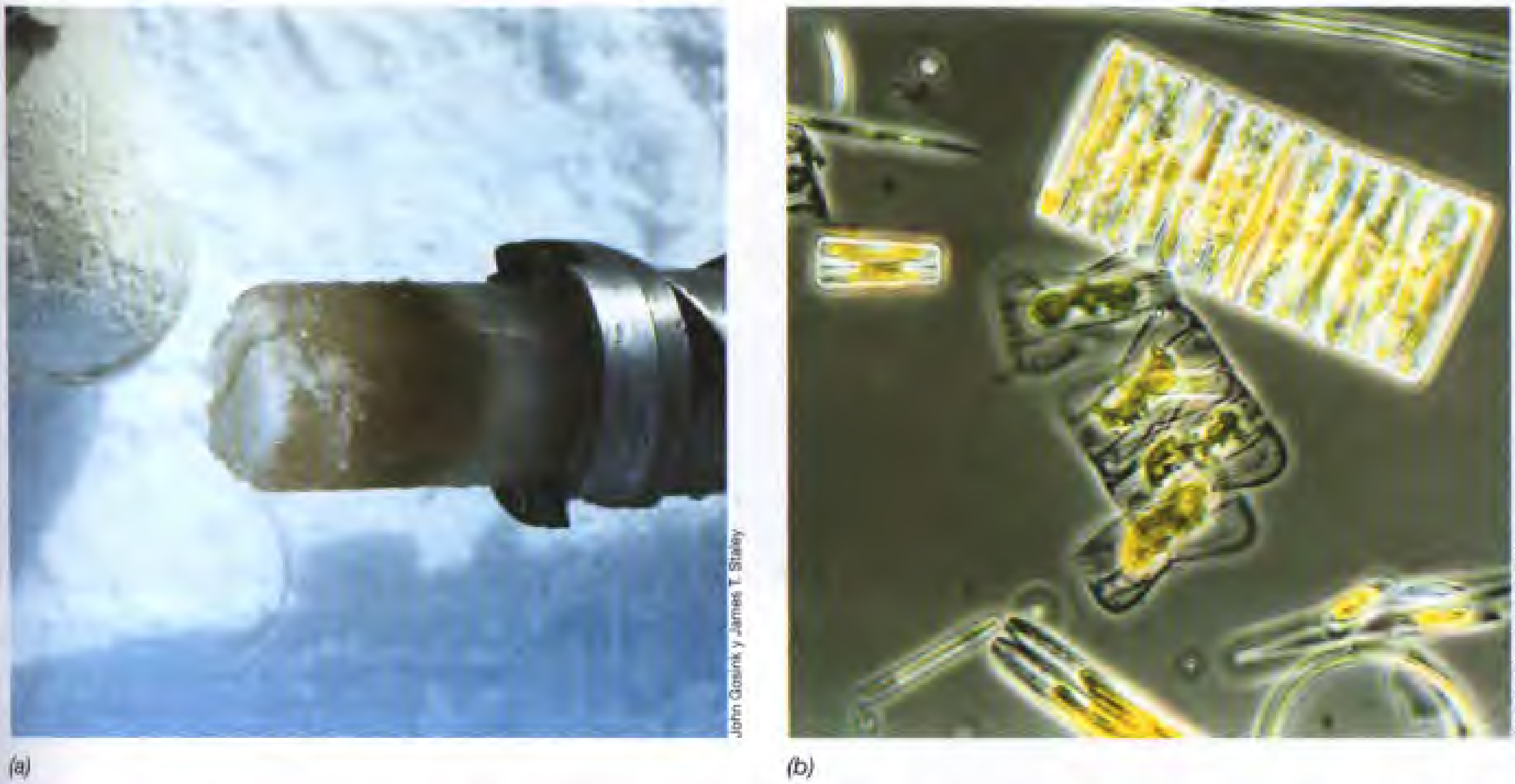


Figura 6.18 Microorganismos del hielo del mar Antártico. (a) Una muestra de agua de mar permanentemente helada de McMurdo Sound, Antártida. Nótese la intensa coloración debida a microorganismos pigmentados y la bota incluida como escala. (b) Micrografía de contraste de fases de microorganismos fototrofos de la muestra anterior. La mayoría de los microoganismos son diatomeas o algas verdes (todos microorganismos eucariotas).

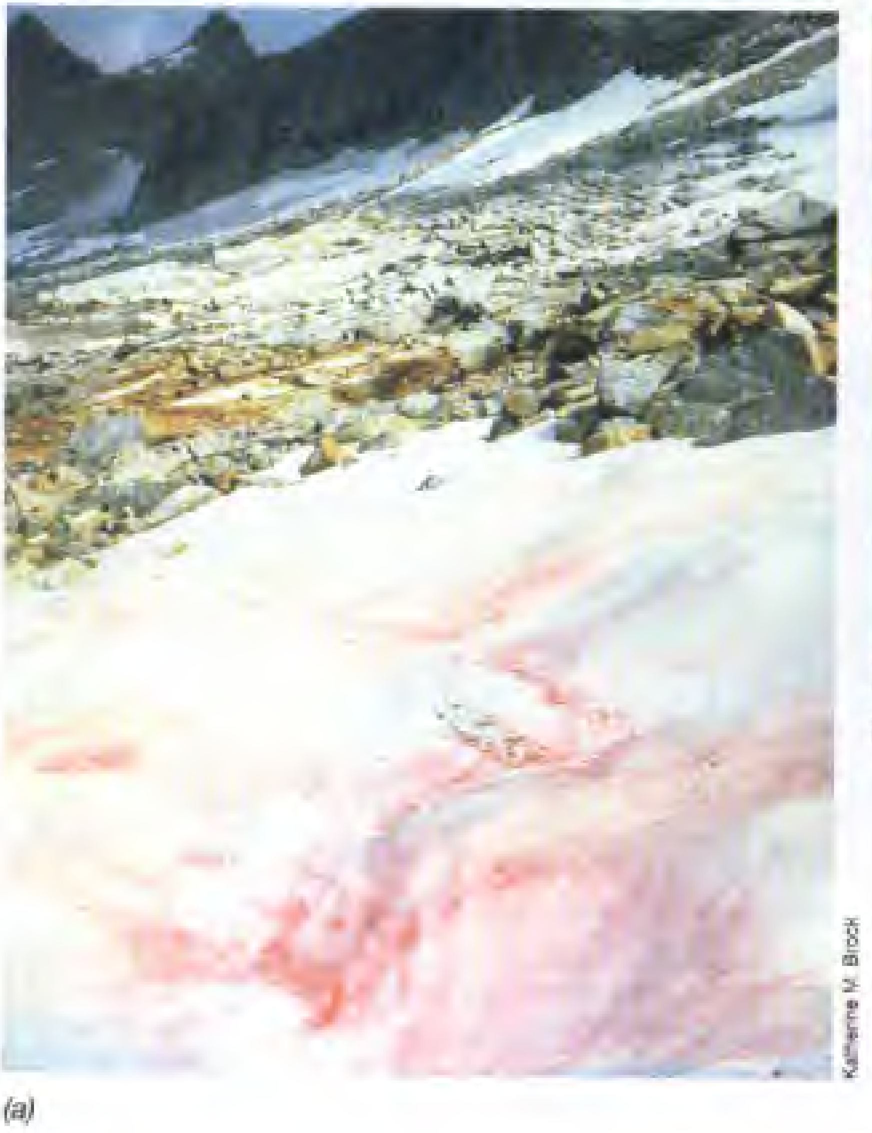
Algunos de los psicrófilos mejor estudiados son algas que crecen en masas densas entre o bajo el hielo de las regiones polares (Figura 6.18*b*). Las algas psicrófilas se observan a menudo sobre la superficie de zonas nevadas y glaciares en número tan elevado que prestan un color rojo o verde a la superficie (Figura 6.19*a*). El alga de las nieves más común es *Chlamydomonas nivalis*, cuyas esporas de color rojo brillante son las responsables de la ocasional tonalidad rojiza de la nieve (Figura 6.19*b*). Esta alga verde crece dentro de la nieve como células vegetativas con pigmentación verdosa y luego esporula; cuando la nieve se derrite, la erosión y la vaporización facilitan que las esporas se concentren en la superficie. Estas algas se ven más frecuentemente en campos de nieve permanente que se derriten en el verano y son bastante comunes en áreas soleadas y secas, ya que en zonas más lluviosas son lavadas de los campos de nieve. Además de las algas de las nieves, se conocen bacterias psicrófilas quimioorganotrofas, muchas de las cuales proceden del Antártico (Figura 6.18*a*). Algunas de éstas tienen la temperatura máxima menor de crecimiento de todos los microorganismos conocidos.

Los microorganismos psicrotolerantes tienen una distribución mucho más amplia que los psicrófilos, y se pueden aislar de suelos y aguas en climas templados así como de carnes, leche y productos derivados, sidra, vegetales y fruta almacenada bajo refrigeración (4°C). Como se ha señalado, los psicrotolerantes crecen mejor a temperaturas entre 20-40°C. Como los ambientes templados se calientan en verano, no se pueden desarrollar en ellos los psicrófilos, que son sensibles al calor, y el calentamiento representa una fuerza selectiva que favorece a las especies de psicrotolerantes y excluye a las formas psicrófilas. Debe señalarse que aunque los psicrotolerantes son capaces de crecer a 0°C, no crecen muy bien a esa temperatura y, a veces, deben esperarse varias semanas antes de que se pueda apreciar el crecimiento de colonias en medios de cultivo. Varios géneros de *Bacteria*, hongos, algas y protozoos tienen representantes que son psicrotolerantes.

Adaptaciones moleculares a la psicrofilia

Los psicrófilos producen enzimas que funcionan óptimamente en frío y que con frecuencia se desnaturalizan o inactivan incluso a temperaturas muy moderadas. Las bases moleculares de este hecho no se conocen por completo pero se ha observado que, en general, las enzimas activas en frío poseen mayor cantidad de hélices-α y menor cantidad de hojas-β en su estructura secundaria (*véanse* Sección 3.7 y Figura 3.16) que las enzimas que son inactivas en frío. La disposición en hoja-β tiende a ser una estructura más rígida, y la mayor cantidad de hélices-α en las enzimas activas en frío puede permitir a estas proteínas mayor flexibilidad en esas condiciones. Las enzimas activas en frío también tienden a tener más aminoácidos polares y menos aminoácidos hidrofóbicos que las enzimas presentes en mesófilos y termófilos, lo que puede servir igualmente de ayuda para matener la proteína flexible y enzimáticamente activa a bajas temperaturas.

Otra característica de los psicrófilos, en comparación con los mesófilos, es que el transporte activo (*véase* Sección 4.7) funciona mejor a baja temperatura, lo que indica que la



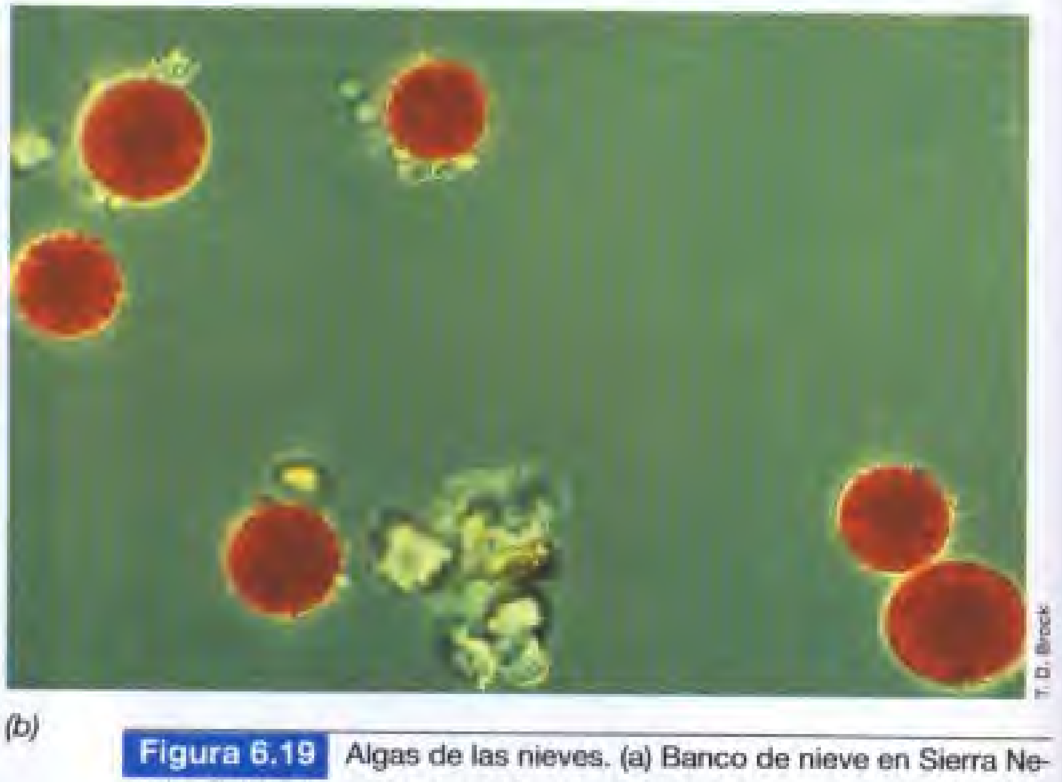


Figura 6.19 Algas de las nieves. (a) Banco de nieve en Sierra Nevada, California, con coloración roja debida a la presencia de algas. La nieve rosada es común durante el verano en bancos de nieve de elevadas altitudes en todo el mundo. (b) Micrografías de esporas pigmentadas en rojo del alga de las nieves *Chlamydomonas nivalis*. Las esporas germinan originando células del alga verdes y móviles. Especies relacionadas con el alga de la nieve que contienen diferentes pigmentos carotenoides (*véase* Sección 17.3) y, por todo, las zonas ocupadas por el alga de la nieve también pueden ser verde, naranja, marrón o púrpura.

membrana citoplasmática de los psicrófilos está construida de tal modo que las bajas temperaturas no inhiben estos fenómenos. Diversos estudios sobre la composición de las membranas en los psicrófilos han puesto de manifiesto que tienen un mayor contenido en ácidos grasos *no saturados* (*véase* Sección 5.15), lo que facilita el estado semifluido de las membranas a baja temperatura (las membranas compuestas fundamentalmente de ácidos grasos saturados se vuelven céreas y no funcionales a esas temperaturas). Los lípidos de algunas bacterias psicrófilas también contienen ácidos grasos poliinsaturados e hidrocarburos de cadena larga con muchos enlaces dobles. A este respecto, en los lípidos de algunas bacterias del Antártico se ha identificado un hidrocarburo con nueve dobles enlaces ($C_{31:9}$), y la bacteria *Psycroflexus* contiene ácidos grasos con 4 y 5 dobles enlaces.

Congelación

A pesar de la capacidad de algunos organismos para crecer a bajas temperaturas, existe un límite por debajo del cual es imposible la reproducción. El agua pura se congela a 0°C y el agua de mar a −2,5°C; pero la congelación no es un proceso homogéneo, e incluso a temperaturas más bajas existen depósitos microscópicos de agua no congelada. Aunque la congelación evita el crecimiento microbiano no causa necesariamente la muerte celular. Además, el medio de suspensión de las células afecta su sensibilidad al frío. Los líquidos solubles en agua, como el glicerol y el dimetilsulfóxido (DMSO), cuando se añaden al medio a una concentración final del 10%, penetran en las células y las protegen de los efectos de la deshidratación a la vez que evitan la formación de cristales de hielo. De hecho, la adición de tales agentes, denominados *crioprotectores* (o criogénicos), es un método habitual para *conservar* los cultivos microbianos a temperaturas muy bajas (normalmente de 70°C a 196°C). Las células congeladas, preparadas adecuadamente, pueden permanecer viables durante mucho tiempo (al menos varias décadas).

✓ 6.9 Revisión de conceptos

Los organismos con temperaturas óptimas bajas se llaman *psicrófilos* y los ejemplos más extremos habitan ambientes permanentemente fríos. Los psicrófilos poseen moléculas biológicas que funcionan mejor a baja temperatura, pero anormalmente sensibles a temperaturas templadas.

- ✓ ¿En qué se diferencia un organismo *psicrófilo* de un *psicrotolerante*?
- ✓ ¿Qué adaptaciones presenta la membrana citoplasmática de los psicrófilos y por qué son necesarias?

6.10 Crecimiento microbiano a altas temperaturas

La vida microbiana crece bien en ambientes con elevada temperatura, incluso en el agua hirviendo. Por encima de 65°C sólo viven las formas *procarióticas* de vida, pero en esas condiciones existe una enorme diversidad de microorganismos pertenecientes a *Bacteris* y *Archaea*. Consideraremos algunos de estos ambientes calientes y sus formas microbianas de vida.

Ambientes con temperaturas altas

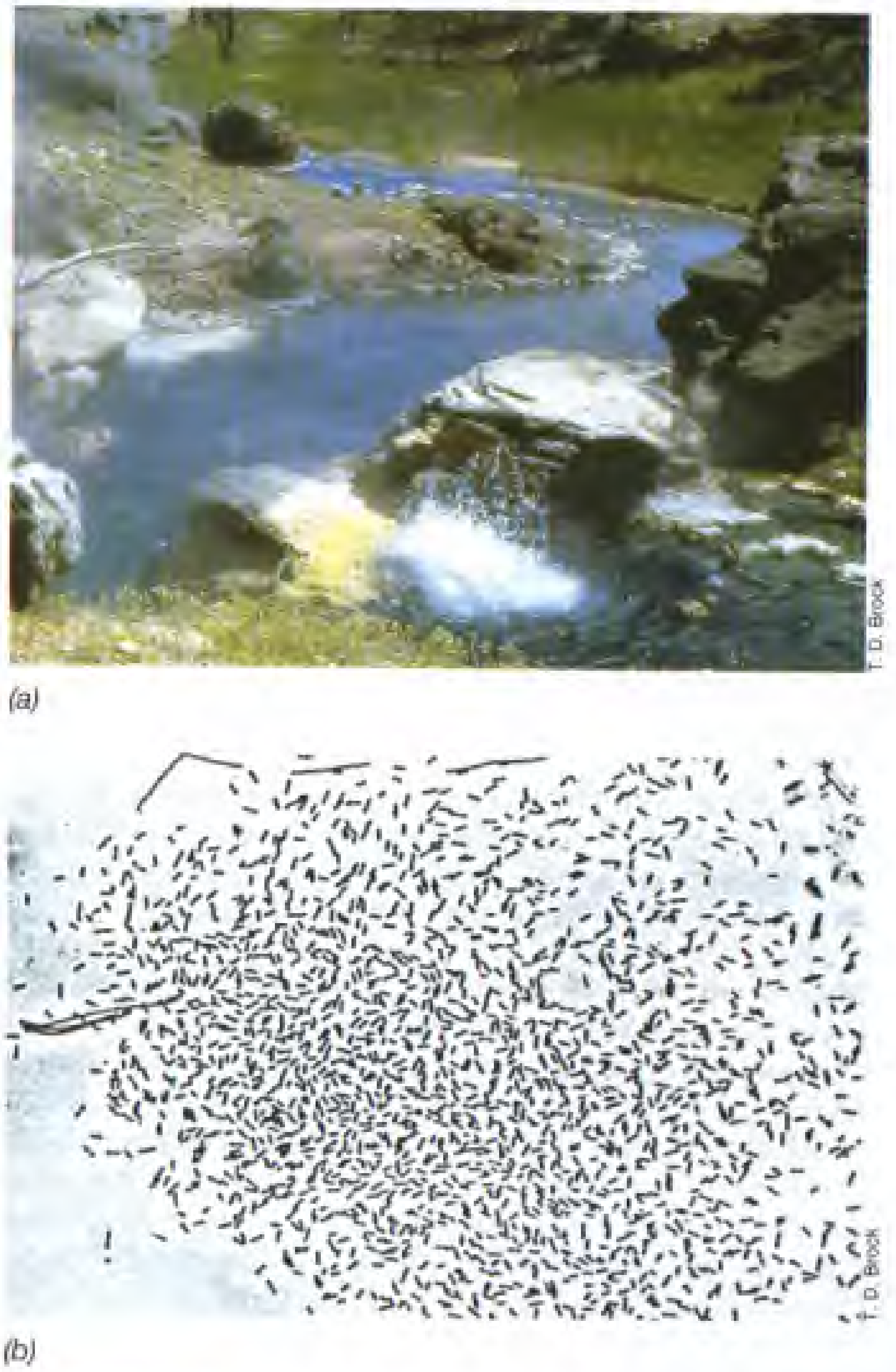
Recordemos que los microorganismos cuya temperatura óptima está por encima de 45°C se llaman **termófilos**; y que aquéllos cuya temperatura óptima está por encima de 80°C son los **hipertermófilos** (Figura 6.17). En la naturaleza, temperaturas tan altas sólo se encuentran en algunas áreas muy restringidas. Por ejemplo, en suelos muy expuestos a la luz solar se alcanzan a mediodía temperaturas superiores a 50°C, e incluso se puede llegar a los 70°C, aunque en unos pocos centímetros por debajo de la superficie la temperatura es mucho más baja. Los materiales en fermentación, como los acúmulos de abono y los ensilados, pueden alcanzar fácilmente temperaturas de 60-65°C. No obstante, en la naturaleza los ambientes extremos más extensos y con temperaturas más altas están asociados a fenómenos volcánicos.

Muchas fuentes termales tienen temperaturas próximas a la de ebullición y las fuentes hidrotermales submarinas (fumarolas) pueden alcanzar los 150-500°C. Las fuentes hidrotermales del fondo de los oceános tienen temperaturas de 350°C o superiores (*véase* Sección 19.8). Las fuentes termales se encuentran distribuídas por todo el mundo, pero se concentran particularmente al oeste de Estados Unidos, Nueva Zelanda, Islandia, Japón, Italia, Indonesia, América Central y África Central. La zona de mayor concentración de este tipo de fuentes termales es el Parque Nacional de Yellowstone, Wyoming (USA). Aunque en algunas fuentes termales la temperatura es variable, en otros es muy constante, con variaciones menores de 1-2°C en varios años. Además, estas fuentes tienen composiciones químicas y valores de pH diversos, y en general contienen niveles suficientes de nutrientes que permiten el crecimiento de poblaciones de quimioorganotrofos y quimiolitotrofos.

Hipertermófilos en fuentes termales

Muchas fuentes termales tienen el agua en el punto de ebullición a una altitud dada (92-93°C en Yellowstone, 99-100°C en localidades más próximas al nivel del mar). En fuentes termales en ebullición (Figura 6.20), hay una gran variedad de hipertermófilos típicos. El crecimiento de estos organismos puede estudiarse mediante la inmersión de portaobjetos (para microscopía) en la fuente y su extracción al cabo de unos días. El examen microscópico de los portaobjetos pone de manifiesto colonias de procariotas (Figura 6.20*b*) que se desarrollan a partir de bacterias aisladas que se adhieren y crecen sobre la superficie del vidrio.

Los estudios ecológicos de estos organismos que viven en fuentes termales en ebullición demuestran que las velocidades de crecimiento son notablemente rápidas y con tiempos de generación inferiores a 1 hora. Se han obtenido cultivos de muchos de estos procariotas y existen muchos tipos morfológicos y fisiológicos (*véase* Capítulo 13). Los estudios filogenéticos basados en la secuenciación del RNA ribosómico (*véanse* Secciones 2.3 y 11.5) han revelado una gran diversidad evolutiva entre estos hipertermófilos, como



T. D. Brock

T. D. Brock

Figura 6.20 Crecimiento de hipertermófilos en agua hirviendo. (a) Boulder Spring, un pequeño arroyo de agua hirviente en el Parque Nacional de Yellowstone. Este arroyo caliente presenta una temperatura de 1-2°C por encima del punto de ebullición. Los depósitos minerales cerca del cauce son de sílice y azufre. (b) Micrografía de una microcolonia de procariotas desarrollada sobre un portaobjetos inmerso en el agua del cauce.

varias *Bacteria* y especialmente *Archaea*. Algunos de estos hipertermófilos presentan temperaturas óptimas *superiores a 100°C* y, por tanto, en el laboratorio se cultivan en cámaras presurizadas que permiten alcanzar temperaturas superiores al punto de ebullición.

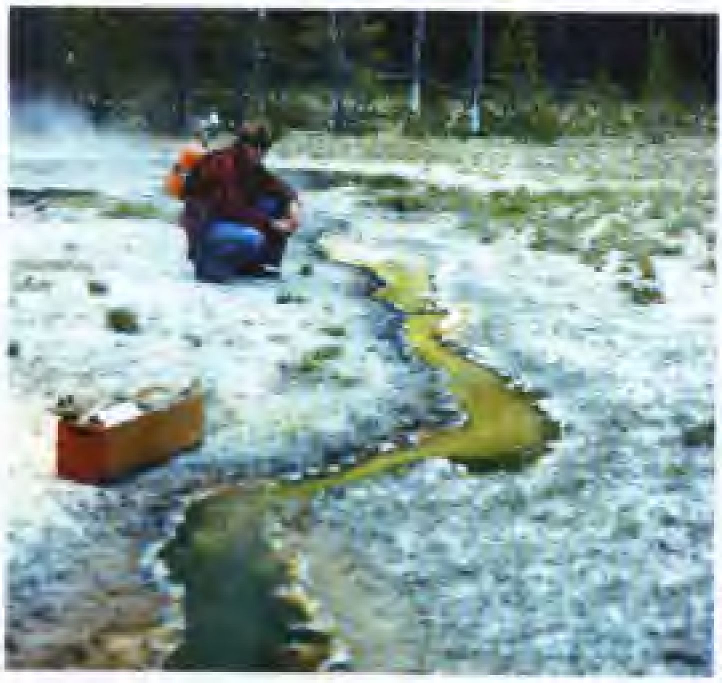
Termófilos

Muchos termófilos (temperatura óptima 45-80°C), se presentan en fuentes termales y en otros ambientes cálidos. En fuentes termales, a medida que el agua hirviendo emerge, se desborda de las orillas y se aleja de la fuente, se enfría gradualmente y origina un *gradiente de temperatura*. A lo largo de este gradiente crecen varios microorganismos (Figura 6.21), con diferentes especies que crecen en los diferentes rangos de temperaturas. Estudiando la distribución de las especies en tales gradientes y examinando las fuentes termales y otros ambientes termales a diferentes temperaturas en distintas partes del mundo, es posible determinar los límites superiores de temperatura para cada clase de organismo (Tabla 6.1). A partir de esta información, se ha llegado a la conclusión de que (1), en general, los organismos procarióticos son capaces de crecer a temperaturas más elevadas que los eucarióticos; (2) los más termófilos de todos los procariotas son algunas especies de *Archaea*; y (3) los organismos no fototróficos son capaces de crecer a temperaturas más elevadas que las formas fototróficas.

Los procariotas termófilos se encuentran también en ambientes térmicos artificiales. Los calentadores de agua domésticos o industriales tienen temperaturas de 55-80°C y constituyen por tanto un hábitat favorable para el crecimiento de procariotas termófilos. En calentadores de agua se han aislado organismos semejantes a *Thermus aquaticus*, un termófilo común en fuentes termales. Las centrales eléctricas, las industrias que usan agua caliente y otras fuentes artificiales de naturaleza térmica son sitios donde pueden crecer los termófilos; y en ellos se pueden aislar fácilmente utilizando técnicas adecuadas de enriquecimiento.

Adaptaciones moleculares a la termofilia

¿Cómo pueden crecer los termófilos y los hipertermófilos a tan altas temperaturas? En primer lugar, sus enzimas y



David M. Ward

Figura 6.21 Crecimiento de una cianobacteria termófila en un arroyo de agua caliente del Parque Nacional de Yellowstone. Patrón de desarrollo característico en el gradiente térmico, formado por cianobacterias en el límite superior de temperatura, 70-74°C. El patrón cambia porque el agua se enfría más rápidamente en los bordes que en el centro del cauce. El agua fluye desde detrás de la fotografía hacia el fondo de la misma. Por encima del lugar donde el científico aparece arrodillado el agua está demasiado caliente para el desarrollo de cianobacterias. El color verdoso se debe a algunas formas de *Synechococcus* resistentes a la temperatura. A medida que fluye el agua en el gradiente, la masa de células aumenta y el color verde se intensifica.

TABLA 6.1 Límites de temperatura conocidos en la actualidad para el crecimiento de seres vivos

Grupo	Límites térmicos superiores (°C)
Animales	
Peces y otros vertebrados acuáticos	38
Insectos	45-50
Ostrácodos (crustáceos)	49-50
Plantas	
Plantas vasculares	45
Musgos	50
Microorganismos eucariotas	
Protozoos	56
Algas	55-60
Hongos	60-62
Procariotas	
Bacteria	
Cianobacterias	70-74
Fototrofos anoxigénicos	70-73
Bacteria	
Quimiorganotrofas/quimiolitotrofas	95
Archaea	
Archaea	
Quimiorganotrofas/quimiolitotrofas	113

otras proteínas son mucho más estables a la temperatura que las de los mesófilos; y el funcionamiento de sus macromoléculas es *óptimo* a altas temperaturas. ¿Cómo logran esta estabilidad al calor? Sorprendentemente, los estudios de varias enzimas termoestables indican que a menudo su secuencia difiere en muy pocos aminoácidos de la de una enzima que cataliza la misma reacción en un mesófilo. Parece ser que la sustitución de un aminoácido crítico en uno o en unos pocos sitios en la enzima, hace que se pliegue de tal modo que hace que sea termoestable. La termoestabilidad de las proteínas en los hipertermófilos también se debe a un aumento en el número de pares iónicos presentes (enlaces iónicos entre las cargas positivas y negativas de varios aminoácidos) y al denso empaquetamiento del interior altamente hidrofóbico de las proteínas, lo que hace que resistan la desnaturalización en el ambiente acuoso del citoplasma. Por último, los hipertermófilos producen ciertos solutos en cantidades significativas, como el di-inositol fosfato, diglícerol fosfato y manosilglicerato, y ayudan a estabilizar las proteínas evitando su degradación térmica.

Además de las enzimas y otros componentes celulares, las membranas citoplasmáticas de los termófilos y de los hipertermófilos han de ser termoestables. Anteriormente mencionamos que los psicrófilos tienen membranas con lípidos ricos en ácidos grasos *poliinsaturados* que mantienen las membranas en estado fluido a bajas temperaturas. A la inversa, los termófilos típicamente presentan lípidos ricos en ácidos grasos *saturados*, que permiten que las membranas permanezcan funcionales y estables a elevadas temperaturas. Los ácidos grasos saturados forman un microambiente más hidrofóbico que los ácidos grasos insaturados, lo que favorece la estabilidad de la membrana. Los hipertermófilos, en su mayoría *Archaea*, no presentan ácidos grasos en sus membranas sino carbohidratos de tipo C_{40} compuestos de unidades repetitivas isoprenoides de cinco átomos de carbono que se unen por enlace éter al glicerol fosfato (*véase* Figura 4.19*c*). Además la estructura global de estas membranas es la de una *monocapa lipídica* (*véase* Figura 4.20*d*), y esta estructura es mucho más termorresistente que la bicapa lipídica de *Bacteria* y *Eukarya*. Los detalles de la arquitectura peculiar de la membrana de las *Archaea* hipertermófilas se presentaron en la Sección 4.5 y otros aspectos sobre la estabilidad al calor de los hipertermófilos, como la del DNA, se considerarán en la Sección 13.11.

Aspectos biotecnológicos de la termofilia

Los microorganismos termófilos e hipertermófilos son interesantes por algo más que por razones de biología fundamental. Estos microorganismos ofrecen importantes ventajas en procesos industriales y biotecnológicos, muchos de los cuales funcionan más rápida y más eficazmente a altas temperaturas. Las enzimas de los termófilos y de los hipertermófilos son capaces de catalizar reacciones a temperaturas elevadas (*véanse* Sección 30.9 y Figura 30.15*b*) y, por ser más estables que las de los mesófilos, la vida media de estas preparaciones enzimáticas es más prolongada. Un ejemplo práctico de enzima termorresistente y de gran importancia aplicada es la DNA polimerasa aislada del termófilo *Thermus aquaticus*. Esta enzima, conocida como *Taq polimerasa*, se usa para la automatización de los pasos repetitivos que tienen lugar en la *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*), una técnica muy importante para la amplificación de secuencias específicas de DNA (*véase* Sección 10.17). Se conocen otras utilidades de las enzimas termorresistentes y de otros productos celulares termoestables que están siendo desarrolladas para aplicaciones industriales.

✓ 6.10 Revisión de conceptos

Los organismos cuyas temperaturas óptimas de crecimiento se sitúan entre 45 y 80°C se llaman *termófilos*, y aquéllos cuyas temperaturas óptimas son superiores a 80°C se llaman *hipertermófilos*. Estos organismos habitan ambientes calientes, como fuentes termales en ebullición y fuentes hidrotermales submarinas que pueden alcanzar temperaturas superiores a los 100°C. Los termófilos y los hipertermófilos producen macromoléculas termoestables.

- ✓ ¿Cuál es el límite superior de temperatura de crecimiento conocido de un procariota? ¿El organismo que crece a esta temperatura es miembro de *Bacteria* o de *Archaea*?
- ✓ ¿Cuál es la estructura de las membranas de los *Archaea* hipertermófilos y por qué esta estructura le permite crecer a temperatura elevada?
- ✓ ¿Qué es la *Taq polimerasa* y por qué es útil en biotecnología?

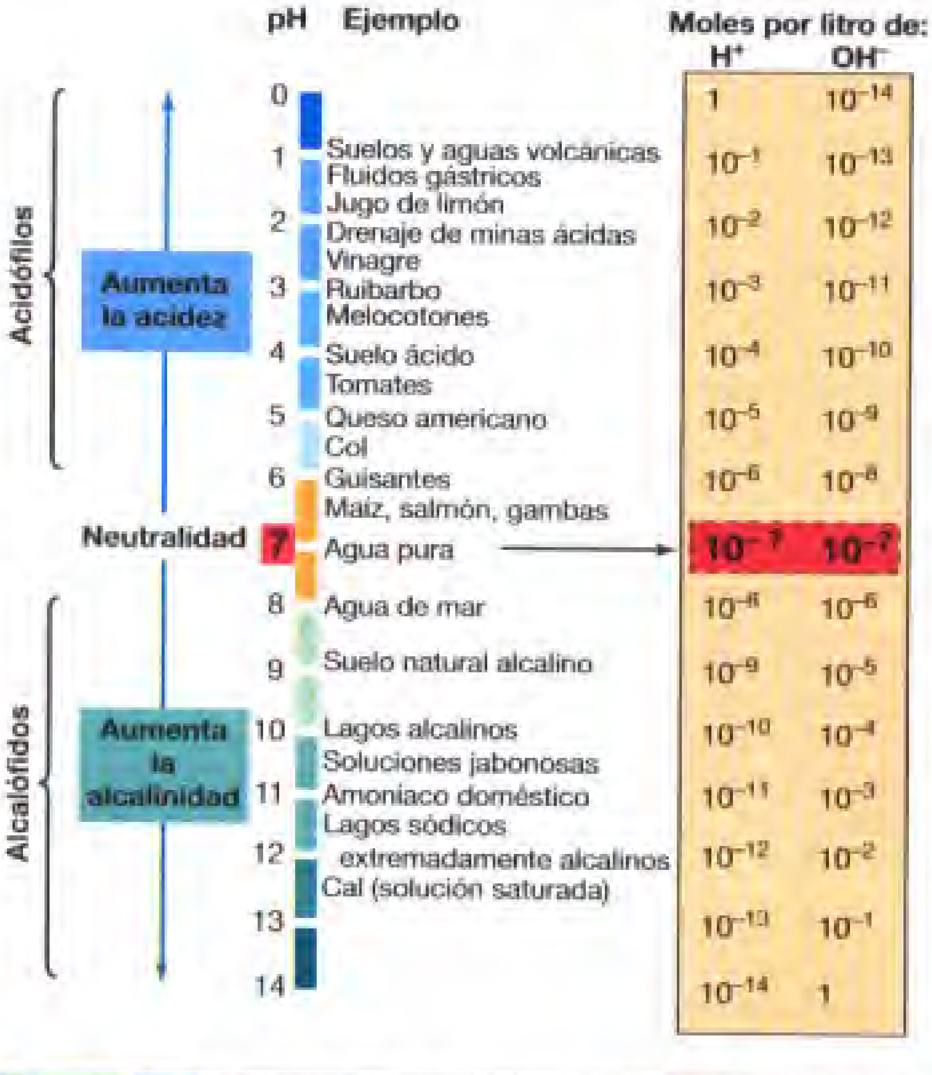
6.11 Crecimiento microbiano a pH alto y a pH bajo

La acidez o alcalinidad de una solución se expresa por su **pH** en una escala en la que la neutralidad es pH 7 (Figura 6.22). Los valores de pH por debajo de 7 son *ácidos* y los mayores de 7 son *alcalinos* (o *básicos*). Es importante tener en cuenta que el pH es una *función logarítmica*; por ello, un cambio en una unidad de pH representa un cambio de *diez veces* en la concentración de hidrogeniones. Así, el vinagre (con pH cercano a 2) y el amoniaco doméstico (con pH próximo a 11) difieren en una concentración de hidrogeniones de mil millones de veces.

pH y crecimiento microbiano

Cada organismo tiene un rango de pH dentro del cual es posible el crecimiento y normalmente posee un pH óptimo bien definido. La mayoría crece en un margen de pH de 2-3 unidades. La mayoría de los ambientes naturales tienen un valor de pH entre 5 y 9, y los organismos con pH óptimos de este orden son los más comunes. Sólo unas cuantas especies pueden crecer por debajo de 2 o por encima de 10. Los organismos que crecen mejor a bajo pH constituyen un tipo de extremófilos llamados **acidófilos**. El grupo de los hongos son más acidófilos que las bacterias. Muchos hongos crecen de forma óptima a pH 5 o inferior e incluso algunos crecen bien a pH 2. Algunas bacterias también son acidófilas. De hecho, algunas de estas bacterias son acidófilas *estrictas*, incapaces de crecer a pH neutro. Entre las bacterias acidófilas estrictas se encuentran varias especies de *Thiobacillus* (*véase* Sección 12.4) y algunos géneros de *Archaea* como *Sulfolobus*, *Thermoplasma* y *Ferroplasma* (*véanse* Secciones 13.5 y 13.9).

El factor crítico más importante para el carácter acidófilo estricto es la estabilidad de la membrana citoplasmática. Cuando el pH es neutro, la membrana citoplasmática de las bacterias muy acidófilas efectivamente se disuelve y las células se lisan, lo que sugiere que para que la membrana citoplasmática sea estable se requieren altas concentraciones de iones hidrógeno. Por ejemplo, el procariota más acidófilo conocido, *Picrophilus oshimae*, es también un termófilo (temperatura óptima de crecimiento 60°C) y crece a un pH óptimo de 0,7; ¡a pH superior de 4, las células de *P. oshimae* se lisan! *P. oshimae* vive en suelos extremadamente ácidos y calientes asociados a una actividad volcánica.



pH
Ejemplo
Moles por litro de:
H⁺
OH⁻
Acidófilos
Aumenta la acidez
0
1 Suelos y aguas volcánicas
Fluidos gástricos
Jugo de limón
2 Drenaje de minas ácidas
Vinagre
3 Ruibarbo
Melocotones
4 Suelo ácido
Tomates
5 Queso americano
Col
6 Guisantes
Maíz, salmón, gambas
Neutralidad 7 Agua pura
8 Agua de mar
9 Suelo natural alcalino
Alcalófilos
Aumenta la alcalinidad
10 Lagos alcalinos
Soluciones jabonosas
11 Amoniaco doméstico
Lagos sódicos
12 extremadamente alcalinos
Cal (solución saturada)
13
14
1 | 10⁻¹⁴
10⁻¹ | 10⁻¹³
10⁻² | 10⁻¹²
10⁻³ | 10⁻¹¹
10⁻⁴ | 10⁻¹⁰
10⁻⁵ | 10⁻⁹
10⁻⁶ | 10⁻⁸
10⁻⁷ | 10⁻⁷
10⁻⁸ | 10⁻⁶
10⁻⁹ | 10⁻⁵
10⁻¹⁰ | 10⁻⁴
10⁻¹¹ | 10⁻³
10⁻¹² | 10⁻²
10⁻¹³ | 10⁻¹
10⁻¹⁴ | 1

Figura 6.22 La escala de pH. Nótese que aunque algunos microorganismos pueden vivir a pH muy alto o muy bajo, el pH intracelular permanece próximo a la neutralidad.

Unos cuantos extremófilos presentan un pH óptimo de crecimiento muy elevado, a veces tan alto como pH 10; se denominan **alcalófilos**. Los microorganismos alcalófilos se encuentran por lo general en hábitat muy básicos como lagos sódicos y suelos muy carbonatados. Sin embargo, los procariotas alcalófilos mejor estudiados han sido bacterias aeróbicas no marinas, muchas de las cuales son especies de *Bacillus*. Algunos microorganismos alcalófilos extremos son también halófilos, y la mayor parte de éstos pertenecen al dominio *Archaea* (*véase* Sección 13.3). Algunos alcalófilos tienen aplicación industrial porque producen enzimas hidrolíticas, como proteasas y lipasas, que funcionan bien a pH alcalino y se usan como aditivos de los detergentes domésticos (*véase* Sección 30.9).

Los alcalófilos también son muy interesantes por los problemas bioenergéticos que plantean al vivir a pH tan alto. Por ejemplo, ¿cómo pueden originar una fuerza motriz de protones (*véase* Sección 5.12) cuando la superficie externa de la membrana es tan alcalina? A partir de los estudios realizados con especies alcalófilas de *Bacillus* se ha puesto de manifiesto que, en vez de la habitual fuerza motriz de protones, es un gradiente de Na^+ el que suministra la energía para el transporte y la movilidad, pero que también se genera una fuerza motriz de protones responsable de la síntesis respiratoria de ATP. Cómo ocurre exactamente es aún un problema interesante por resolver en la investigación actual de la alcalifilia.

pH intracelular

Cuando se considera para cada organismo particular el requerimiento de un pH específico para el crecimiento, hay que tener en cuenta que el pH óptimo representa sólo el pH del medio *extracelular*; el pH *intracelular* debe permanecer próximo a la neutralidad para evitar la destrucción de las macromoléculas celulares que son sensibles al ácido o al álcali. En los acidófilos o alcalófilos extremos, el pH intracelular puede variar algunas unidades respecto a la neutralidad, pero en la mayoría de los microorganismos cuyo pH óptimo para el crecimiento está entre 6 y 8 (los llamados **neutrófilos**), el citoplasma permanece neutro o muy próximo a la neutralidad (Figura 6.22).

En el acidófilo antes mencionado, *P. oshimae*, el pH intracelular es 4,6 y en los alcalófilos extremos se ha logrado medir un pH intracelular de hasta 9,5. No se sabe con certeza si estos valores representan respectivamente los valores más bajos y más altos de pH intracelular, pero tales límites deben de ser muy próximos a éstos, pues la estabilidad de las macromoléculas estaría en serio peligro por debajo o por encima de tales valores.

Tampones

En cultivos en medio no renovado (sistemas cerrados), el pH cambia durante el crecimiento a consecuencia de las reacciones metabólicas que consumen o producen sustancias ácidas o básicas. Por eso, se añaden con frecuencia a los medios de cultivo microbianos sustancias amortiguadoras denominadas *tampones*, a fin de mantener el pH relativamente constante. Tales tampones de pH funcionan en un rango estrecho de valores de pH; por tal motivo, se usan diferentes tampones para mantener diferentes valores de pH. Para valores de pH próximos a la neutralidad (pH 6-7,5) el tampón fosfato, normalmente añadido como KH_2PO_4, es un tampón excelente. Existen otros muchos tampones que se emplean en los medios de cultivo o en el ensayo de enzimas obtenidas de células microbianas, y el mejor sistema tamponante para un organismo o enzima puede ser considerablemente diferente del apropiado para otro. Por tanto, debe determinarse de modo empírico el más adecuado para cada caso, aunque en el caso de ensayos enzimáticos *in vitro*, un determinado tampón que funcione bien con la enzima de un organismo suele funcionar bien en el ensayo de la misma enzima de otros microorganismos.

✓ 6.11 Revisión de conceptos

La acidez o alcalinidad de un medio tiene una gran influencia sobre el crecimiento microbiano. Algunos microorganismos crecen mejor a pH bajo o a pH alto, aunque la mayoría lo hacen a pH entre 6 y 8. El pH intracelular debe permanecer próximo a la neutralidad, aunque el pH externo sea altamente ácido o básico.

- ✓ ¿Cuál es el incremento en protones (H^+) de una solución que pasa de pH 7 a pH 4?
- ✓ ¿Qué son los *tampones* y por qué son necesarios?

6.12 Efectos osmóticos sobre el crecimiento microbiano

El agua es el solvente de la vida. Todos los organismos necesitan agua y la disponibilidad de agua es un factor importante que en la naturaleza determina el crecimiento de los microorganismos. La disponibilidad de agua no sólo es función del contenido en agua que está presente en un medio, es decir, de la humedad o sequedad de un determinado hábitat, sino que también depende de la concentración de solutos, como sales, azúcares y otras sustancias que puedan estar presentes en el agua. Esto se debe a que las sustancias disueltas tienen una cierta afinidad por el agua que hace que el agua asociada a los solutos no esté disponible para los organismos.

Actividad de agua, ósmosis y halófilos

La disponibilidad del agua se expresa en términos físicos como la **actividad de agua.** La actividad de agua, abreviadamente a_w, es el cociente entre la presión de vapor del aire en equilibrio con una sustancia o solución y la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura. Los valores de a_w varían entre 0 y 1, y algunos valores representativos se indican en la Tabla 6.2. La actividad de agua de terrenos agrícolas oscila generalmente entre 0,90 y 1.

El agua difunde desde una región con una alta concentración de agua (baja concentración de solutos) hasta una región con menor concentración de agua (mayor concentración de solutos) por el proceso denominado *ósmosis*. En la mayoría de los casos, el citoplasma de una célula tiene una concentración de solutos mayor que el medio, por lo que el agua tiende a entrar dentro de la célula, diciéndose entonces que existe un *balance de agua positivo*. Sin embargo, cuando una célula está en un medio con baja actividad de agua, existe una tendencia del agua a salir de la célula.

En la naturaleza, los efectos osmóticos tienen interés principalmente en hábitat con altas concentraciones de sales. El agua de mar contiene aproximadamente un 3% de NaCl además de pequeñas cantidades de otros minerales y elementos. Los microorganismos marinos generalmente tienen una dependencia específica del ion sodio además de tener un crecimiento óptimo al valor de actividad de agua propio del agua de mar (Figura 6.23). Tales microorganismos se llaman **halófilos**. El crecimiento de los halófilos requiere al menos algo de NaCl, pero el óptimo varía con el organismo; así, se usan los términos *halófilos discretos* y *halófilos moderados*, para describir a los halófilos con requerimientos bajos (1-6%) y moderados (6-15%) de NaCl, respectivamente (Figura 6.23).

La mayoría de los microorganismos son incapaces de existir en ambientes con actividad de agua muy baja y mueren, o se deshidratan y pasan a un estado de latencia, en tales circunstancias. Los organismos **halotolerantes** pueden soportar alguna reducción en el valor a_w del medio, pero generalmente crecen mejor en ausencia de solutos añadidos (Figura 6.23). Por el contrario, algunos organismos se desarrollan con muy baja actividad de agua, y éstos son de

TABLA 6.2 Actividad de agua en varias sustancias

Actividad de agua (a_w)	Material	Ejemplo de organismo[a]
1,000	Agua pura	*Caulobacter*, *Spirillum*
0,995	Sangre humana	*Streptococcus*, *Escherichia*
0,980	Agua de mar	*Pseudomonas*, *Vibrio*
0,950	Pan	Muchos bacilos Gram positivos
0,900	Jarabe de arce, jamón	Cocos Gram positivos como *Staphylococcus*
0,850	Chorizo	*Saccharomyces rouxii* (levadura)
0,800	Pastel de frutas, mermelada	*Saccharomyces bailii*, *Penicillium* (hongo)
0,750	Pescado salado	*Halobacterium*, *Halococcus*
0,700	Cereales, caramelos, frutos secos	*Xeromyces bisporus* y otros hongos xerófilos

[a] Ejemplos entre otros muchos procariotas u hongos conocidos capaces de crecer en medios de cultivo ajustados a la actividad de agua mencionada.

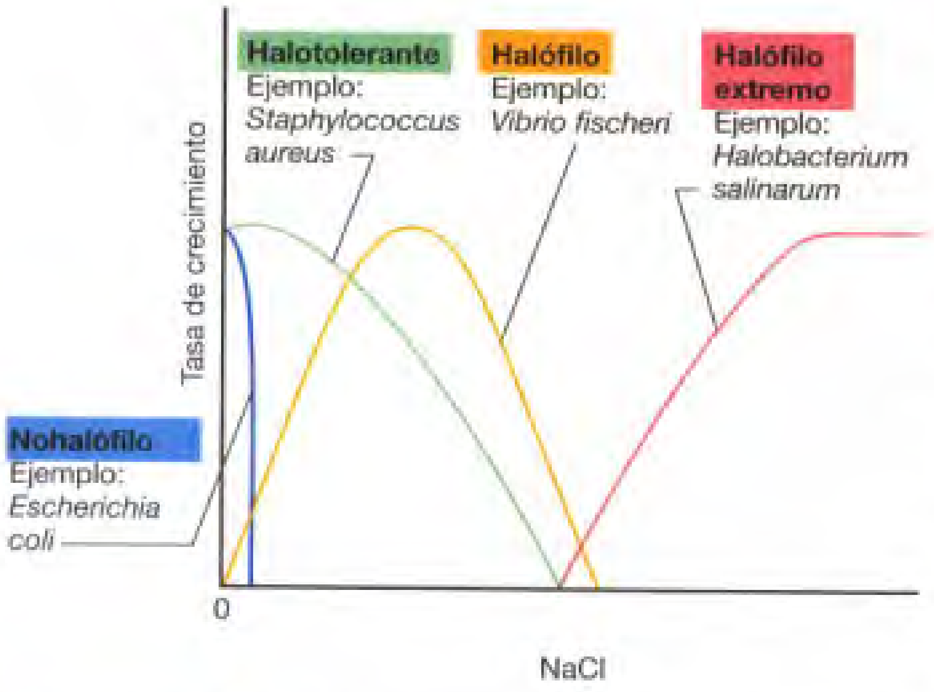


Figura 6.23 Efecto de la concentración del ion sodio sobre el crecimiento de microorganismos con diferentes tolerancias o requerimientos de sal. La concentración de NaCl óptima para microorganismos marinos como *V. fischeri* es de alrededor del 3%; para halófilos extremos está entre el 15 y el 30% dependiendo del organismo.

gran interés, no sólo desde el punto de vista de su adaptación a la vida en estas condiciones sino también desde el punto de vista aplicado en la industria alimentaria, donde solutos como la sal y la sacarosa se emplean frecuentemente como conservantes para inhibir el crecimiento microbiano. Los organismos capaces de crecer en ambientes muy salinos se llaman **halófilos extremos** (Figura 6.23) y, según las especies, requieren 15-30% de NaCl para su crecimiento óptimo (*véase* Sección 13.3). Los organismos capaces de crecer en ambientes con alta concentración de azúcares se denominan **osmófilos**, y aquellos capaces de crecer en ambientes muy secos (por la falta de agua) se llaman **xerófilos**. La Tabla 6.2 recoge ejemplos de estos organismos.

Solutos compatibles

¿Cómo crecen los organismos en condiciones de baja actividad de agua? Cuando un organismo crece en un medio con baja actividad de agua sólo puede obtener agua del ambiente incrementando su concentración *interna* de solutos. Tal aumento puede llevarse a cabo aumentando el bombeo de iones inorgánicos hacia el interior de la célula a partir del medio ambiente, o bien sintetizando o concentrando un soluto orgánico. Se conocen organismos que emplean alguno de estos mecanismos y la Tabla 6.3 recoge algunos ejemplos.

El soluto utilizado en el interior de la célula para ajustar la actividad de agua del citoplasma no debe inhibir los procesos bioquímicos celulares; tales compuestos se llaman **solutos compatibles**. En los microorganismos existen diferentes solutos compatibles (Tabla 6.3 y Figura 6.24). Todas estas sustancias son muy solubles en agua y se trata de azúcares o alcoholes derivados de azúcares, de otro tipo de alcoholes, de aminoácidos o derivados de aminoácidos o bien de iones potasio (de KCl), como en el caso de *Archaea* halófilas extremas y muy pocas *Bacteria* halófilas extremas (Tabla 6.3). Los solutos compatibles los sintetiza directamente el microorganismo o en algunos casos (como cuando se trata de glicina betaína o de KCl) los acumula del medio. La concentración intracelular de los solutos compatibles depende del nivel de los solutos externos, y para cada organismo la cantidad máxima que puede sintetizar o acumular es una característica genética; esto origina que diferentes organismos puedan tolerar diferentes rangos de potencial de agua (Tablas 6.2 y 6.3). En consecuencia, los microorganismos no halotolerantes, los halotolerantes, los halófilos y los halófilos extremos, en gran medida quedan definidos por su distinta capacidad genética para sintetizar o acumular solutos compatibles.

Los cocos Gram positivos del género *Staphylococcus* son muy halotolerantes (de hecho, un procedimiento habitual para aislarlos se basa en usar medios que contienen un 7,5% de NaCl), y estos organismos utilizan el aminoácido *prolina* como soluto compatible. La *glicina betaína* es un de-

TABLA 6.3 Solutos compatibles de microorganismos

Organismo	Principales solutos acumulados	a_w mínima para crecimiento
Bacterias, no fototrofas	Glicina betaína, prolina (principalmente Gram positivas), glutamato (principalmente Gram negativas)	0,97-0,90
Cianobacterias de agua dulce	Sacarosa, trehalosa	0,98
Cianobacterias marinas	α-glucosilglicerol	0,92
Algas marinas	Manitol, varios glicósidos, prolina, propionato de dimetilsulfonio	0,92
Cianobacterias de lagos salinos	Glicina betaína	0,90-0,75
Bacteria halófilas fototrofas anoxigénicas (Especies *Ectothiorhodospira / Halorhodospira* y *Rhodospirillum*)	Glicina betaína, ectoína, trehalosa	0,90-0,75
Archaea halófilas extremas (por ejemplo, *Halobacterium*) y algunas *bacterias* (por ejemplo, *Haloanaerobium*)	KCl	0,75
Dunaliella (alga verde halófila)	Glicerol	0,75
Levaduras xerófilas	Glicerol	0,83-0,62
Hongos filamentosos xerófilos	Glicerol	0,72-0,61

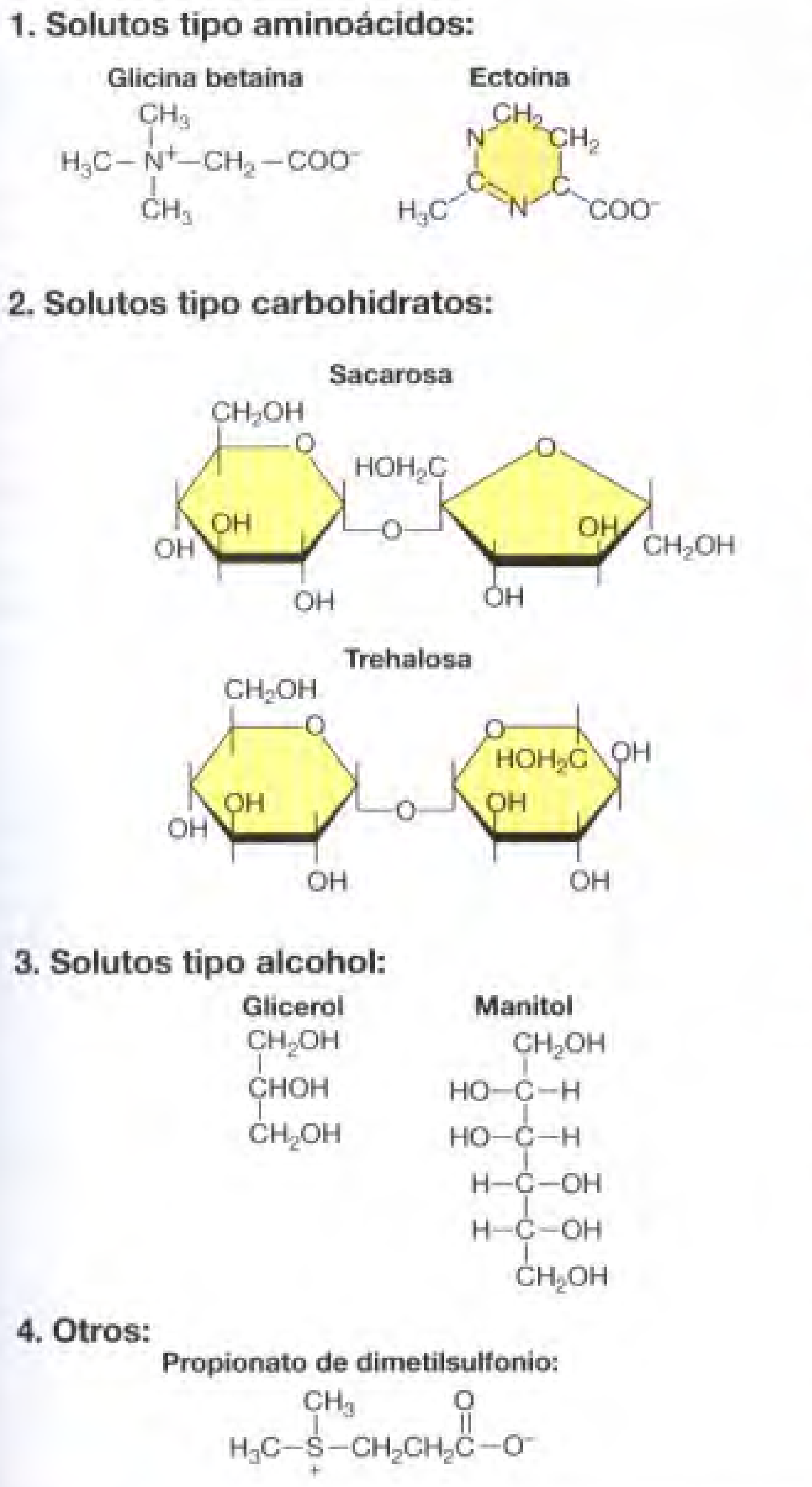

1. Solutos tipo aminoácidos:
Glicina betaína
Ectoína
2. Solutos tipo carbohidratos:
Sacarosa
Trehalosa
3. Solutos tipo alcohol:
Glicerol
Manitol
4. Otros:
Propionato de dimetilsulfonio:

Figura 6.24 Estructura de algunos solutos compatibles frecuentes en microorganismos. Las estructuras del glutamato y prolina, que son también frecuentes, se mostraron al hablar de los aminoácidos (Figura 3.12). El nombre formal de la ectoína es 1,4,5,6-tetrahidro-2-metil-4-pirimidina carboxilato. Nótese que todos los compuestos indicados son moléculas muy polares (solubles en agua).

rivado del aminoácido glicina, en el que los protones del grupo amino se han sustituido por tres grupos metilo; esto deja una carga positiva permanente en el átomo de nitrógeno que aumenta la solubilidad de la sustancia. La glicina betaína está ampliamente distribuida como soluto compatible, especialmente entre *Bacteria* halófilas y cianobacterias (Tabla 6.3). Algunas bacterias halófilas extremas producen otro soluto compatible llamado *ectoína* (Figura 6.24), un derivado cíclico del aminoácido aspartato. Las algas marinas producen una gran variedad de glicósidos pero, con raras excepciones, sólo los acumulan en baja cantidad porque no suelen ser muy halófilas. Las levaduras xerófilas y las algas verdes halófilas producen principalmente *glicerol* como soluto compatible. En la Tabla 6.3 se indica una lista de otros ejemplos de solutos compatibles cuyas estructuras aparecen en la Figura 6.24.

✓ 6.12 Revisión de conceptos

La actividad de agua llega a ser limitante para un organismo cuando aumenta la concentración de soluto disuelto en el medio. Para equilibrar esta situación, los organismos producen o acumulan solutos compatibles intracelulares que funcionan manteniendo la célula en un balance de agua positivo. Algunos microorganismos son capaces de crecer mejor con potenciales de agua reducidos, e incluso algunos elevados requieren niveles de sales para crecer.

- ✓ ¿Cuál es el valor a_w del agua pura?
- ✓ ¿Qué es un *soluto compatible* y para qué se necesita?
- ✓ ¿Cuál es el soluto compatible en especies de *Halobacterium*?

6.13 Oxígeno y crecimiento microbiano

Como los humanos tienen necesidad absoluta de oxígeno molecular (O_2) para vivir, resulta fácil suponer que todas las formas de vida requieren también O_2. Sin embargo, esto no es cierto y muchos microorganismos pueden (y algunos deben) vivir en ausencia total de O_2. El oxígeno es poco soluble en agua y puede consumirse rápidamente debido a las actividades respiratorias de los microorganismos en los hábitat acuáticos y húmedos (especialmente cuando contienen abundancia de materia orgánica). Por ello, existen en nuestro planeta abundantes hábitat microbianos anóxicos (libres de O_2), como los fangos y otros sedimentos, pantanos y ciénagas, suelos forestales inundados, tracto intestinal de los animales, sedimentos de las aguas residuales, zonas profundas de la subcorteza terrestre y muchos otros ambientes. En estos hábitat anóxicos proliferan microorganismos, particularmente procarióticos.

Clases de microorganismos en relación al Oxígeno

Los microorganismos son muy variados en cuanto a la necesidad o tolerancia del oxígeno y, como se señala en la Tabla 6.4, se pueden dividir en varios grupos dependiendo del efecto del oxígeno. Los **aerobios** son especies capaces de crecer a tensiones de oxígeno normales (el 21% del aire es O_2) y muchos, incluso, pueden tolerar concentraciones más elevadas de oxígeno (oxígeno hiperbárico). Los **microaerófilos**, por el contrario, son aerobios que pueden usar el O_2 sólo cuando está presente a niveles más bajos que en el aire, normalmente a causa de su limitada capacidad para respirar o porque contienen alguna molécula sensible al oxígeno, como por ejemplo alguna enzima lábil en presencia de oxígeno. Muchos aerobios son **facultativos**, lo que significa que en condiciones nutritivas y de cultivo apropiadas pueden crecer *tanto* en condiciones aeróbicas como anaeróbicas.

Algunos microorganismos no pueden respirar O_2; tales organismos se llaman **anaerobios**. Existen dos clases de anaerobios: los **anaerobios aerotolerantes**, que toleran el

TABLA 6.4 Relaciones microbianas con el oxígeno

Grupo	Relación con el O_2	Tipo de metabolismo	Ejemplo[a]	Hábitat[b]
Aerobios				
Estrictos	Necesario	Respiración aerobia	*Micrococcus luteus* (B)	Piel, polvo
Facultativos	No necesario, pero crecen mejor con O_2	Respiración aerobia, anaerobia, fermentación	*Escherichia coli* (B)	Intestino
Microaerófilos	Necesario pero a bajas tensiones	Respiración aerobia	*Spirillum volutans* (B)	Lagos
Anaerobios				
Aerotolerantes	No necesario, ni crecen mejor con O_2	Fermentación	*Streptococcus pyogenes* (B)	Tracto respiratorio superior
Estrictos	Dañino o letal	Fermentación o respiración anaerobia	*Methanobacterium formicicum* (A)	Digestores de aguas negras, sedimentos lacustres anóxicos

[a] Los paréntesis indican la posición filogenética (B, *Bacterias*; A, *Arqueas*). En cada categoría se conocen ejemplos representativos de los dos dominios. La mayoría de los eucariotas son aerobios estrictos, pero también hay anaerobios facultativos (por ejemplo, levaduras) y anaerobios estrictos (por ejemplo, algunos protozoos y hongos).

[b] Hábitat típicos del microorganismo indicado en cada caso.

oxígeno y crecen en su presencia aunque no pueden usarlo, y los **anaerobios estrictos** que son inhibidos o incluso mueren en presencia de oxígeno (Tabla 6.4). Se desconoce la razón por la que los anaerobios estrictos mueren en presencia de oxígeno, pero puede deberse a que son incapaces de eliminar algunos productos tóxicos que se originan en el metabolismo del oxígeno (ver más adelante).

Por lo que se sabe, la anaerobiosis estricta ocurre en tres clases de microorganismos: una amplia variedad de procariotas, unos cuantos hongos y unos cuantos protozoos. Dentro del dominio *Bacteria*, uno de los grupos mejor conocidos de anaerobios estrictos es el del género *Clostridium*, formado por bacilos Gram positivos formadores de endosporas. Los clostridios son muy frecuentes en el suelo, en sedimentos lacustres y en el tracto intestinal, y a menudo son los responsables del deterioro de los alimentos enlatados (*véanse* Secciones 12.21 y 29.2). Otras bacterias anaerobias estrictas se encuentran entre los microorganismos metanogénicos y otras muchas especies de *Archaea* (*véase* Capítulo 13), las bacterias sulfatorreductoras y las homoacetogénicas (*véanse* Capítulos 12 y 13), así como muchas de las bacterias que habitan el tracto intestinal de los animales (*véase* Sección 21.4). No obstante entre los anaerobios estrictos la sensibilidad al oxígeno varía ampliamente, pues algunos organismos son capaces de tolerar trazas de oxígeno mientras que otros no.

Cultivos microbianos y los efectos del oxígeno

Para el crecimiento de muchos microorganismos aeróbicos es necesario suministrar una fuerte aireación. Esto se debe a que el O_2 es poco soluble en agua, y el O_2 usado por los organismos durante el crecimiento no se reemplaza lo suficientemente rápido por difusión a partir del aire. Por tanto, es deseable la aireación forzada de los cultivos, bien sea por agitación de los matraces o tubos en una bandeja de agitación, o mediante burbujeo de aire esterilizado a través del medio mediante un tubo fino de vidrio o un disco poroso. Normalmente, los aerobios crecen mejor con aireación forzada que cuando se suministra el O_2 por simple difusión.

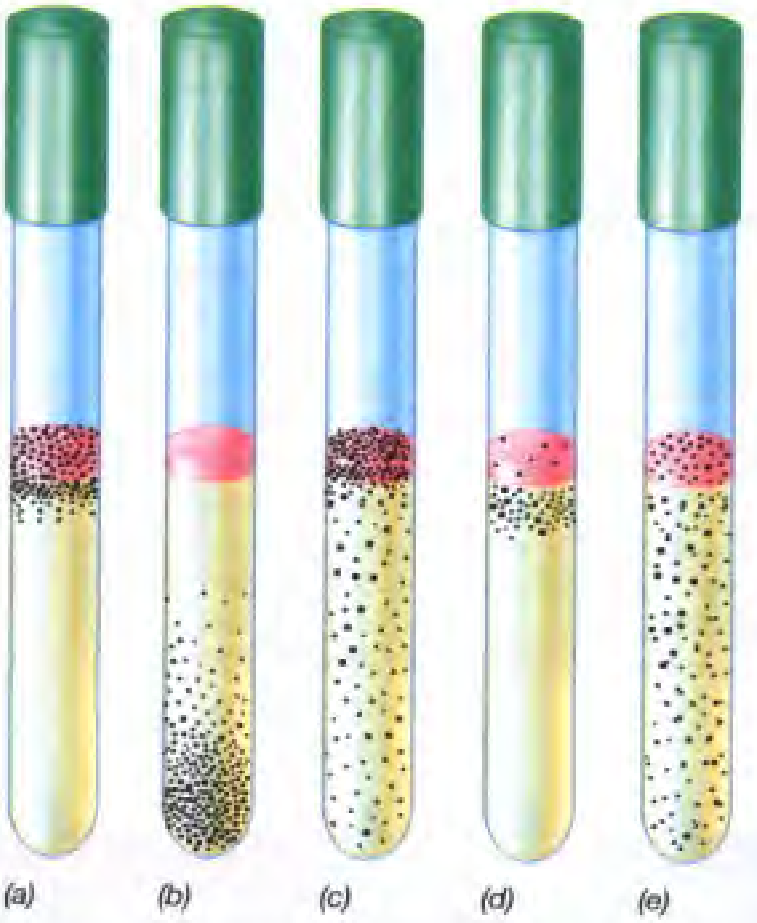


Figura 6.25 Crecimiento de aerobios, anaerobios, facultativos, microaerófilos y anaerobios aerotolerantes, puesto de manifiesto por la posición de microcolonias (representadas como puntos negros) en tubos con medio de cultivo semisólido con tioglicolato. Se añade a los cultivos una pequeña cantidad de agar para evitar perturbaciones en el medio líquido y como indicador un colorante redox, resazurina, que es rosa cuando se oxida e incoloro cuando se reduce. (a) El oxígeno penetra sólo una corta distancia en el tubo, de modo que los aerobios estrictos sólo crecen en la superficie. (b) Los anaerobios, como son sensibles al oxígeno, sólo crecen lejos de la superficie. (c) Los aerobios facultativos son capaces de crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno y crecen por todo el tubo. (d) Los microaerófilos crecen apartándose de la zona más óxica. (e) Los anaerobios aerotolerantes crecen por todo el tubo. No obstante, el crecimiento no es mejor cerca de la superficie porque estos organismos sólo son fermentadores.

En el caso de los cultivos de anaerobios el problema es *excluir*, no suministrar, el oxígeno. Como el oxígeno está presente en el aire se requieren métodos especiales para el cultivo de microorganismos anaeróbicos. Los anaerobios estrictos varían en su sensibilidad al oxígeno, de modo que existen diversos procedimientos para reducir el contenido en O_2 de los cultivos; algunos muy simples y adecuados para los organismos menos sensibles, pero otros más complejos y necesarios para el crecimiento de los anaerobios estrictos.

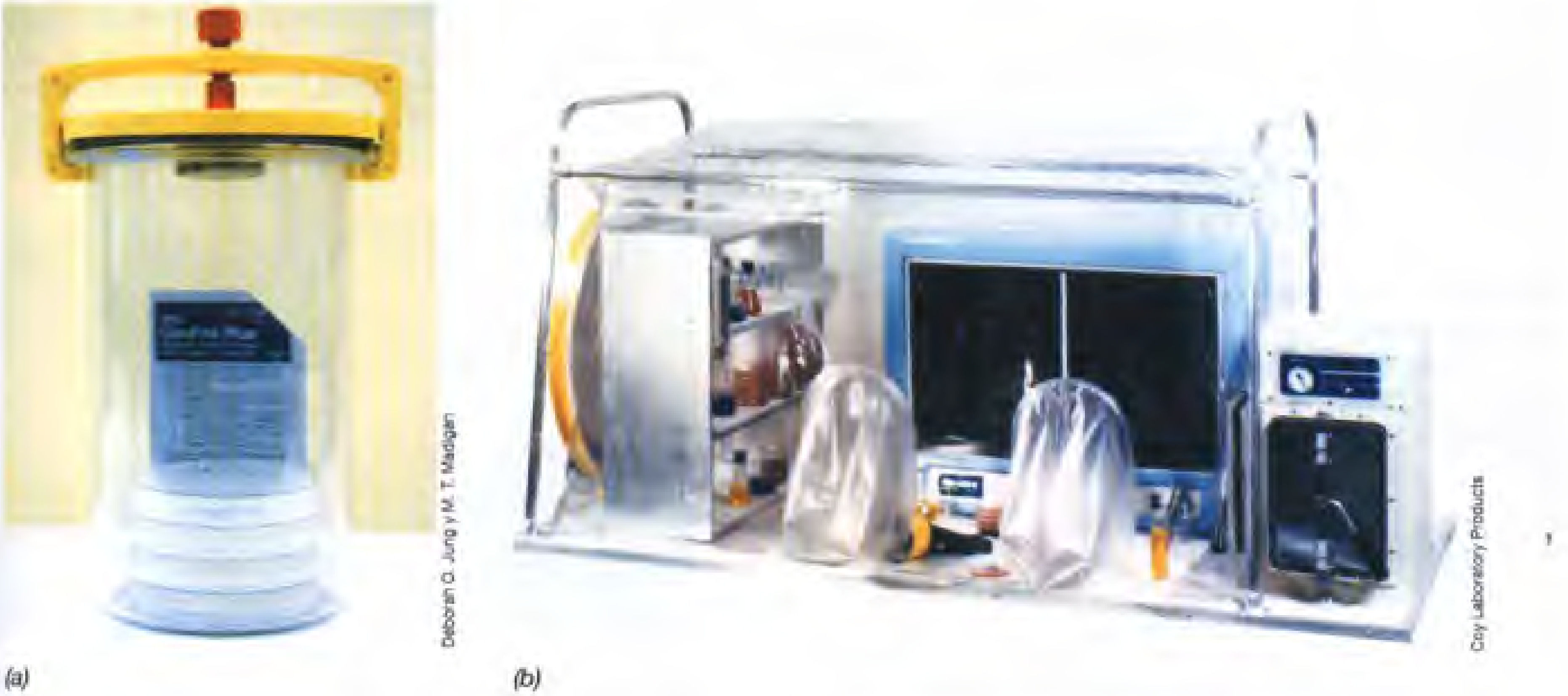
Para los organismos que no son demasiado sensibles a pequeñas cantidades de oxígeno, llenar completamente las botellas o tubos con medio de cultivo hasta arriba y cerrar con tapones herméticos, permite condiciones anóxicas adecuadas. También es posible añadir un compuesto químico que sea un *agente reductor* capaz de reaccionar con el oxígeno y reducirlo a H_2O. Un buen ejemplo es el *tioglicolato*, que se añade a un medio denominado *caldo de tioglicolato* y normalmente se usa para ver cuáles son los requerimientos de O_2 de un organismo (Figura 6.25). Después de que el tioglicolato reacciona con el oxígeno a lo largo del tubo, el oxígeno atmosférico sólo puede penetrar en la parte superior donde el medio contacta con el aire. Los aerobios estrictos crecerán sólo en la parte superior del tubo. Los organismos facultativos crecerán por todo el tubo, pero con preferencia en la parte superior. Los microaerófilos lo harán cerca del extremo superior, pero no justo en la superficie del medio (Figura 6.25). Finalmente, los anaerobios crecerán fundamentalmente cerca del fondo del tubo, donde el oxígeno no puede penetrar (Figura 6.25). Es frecuente añadir al medio un colorante indicador redox como la *resazurina*, que cambia de color en presencia de oxígeno y por tanto señala el grado de penetración del oxígeno en el medio (Figura 6.25).

Para eliminar por completo toda traza de O_2 del cultivo de anaerobios, puede colocarse un gas que reaccione con el O_2 en una jarra que a su vez contenga los tubos o las placas. El dispositivo más sencillo es la *jarra de anaerobios*, un contenedor con una tapadera que puede sellarse y dentro del cual se colocan los tubos o las placas que se van a incubar (Figura 6.26*a*). El aire del recipiente se reemplaza luego por una mezcla de H_2 y CO_2, y las trazas de O_2 que pudieran quedar en el contenedor o en el medio se consumen por acción de un catalizador químico, estableciéndose las condiciones anóxicas.

Para el cultivo de anaerobios estrictos como los metanógenos (*véase* Sección 13.4) no sólo es necesario eliminar todas las trazas de O_2 sino también realizar todas las manipulaciones del cultivo en una atmósfera anóxica, ya que estos microorganismos pueden morir tras una breve exposición al O_2. En estos casos, el medio de cultivo se hierve primero para eliminar el oxígeno, y luego se añade un agente reductor como H_2S y se sella la muestra en una atmósfera de un gas libre de oxígeno. Todas las manipulaciones hay que realizarlas bajo una corriente gaseosa de hidrógeno o nitrógeno libres de O_2 que se dirige al recipiente de cultivo cada vez que se abre, evitando así el O_2 que pudiera entrar. Para llevar a cabo investigaciones con anaerobios estrictos es necesario disponer de *cámaras anóxicas*, que son dispositivos especiales diseñados con guantes incorporados que permiten trabajar desde fuera con cultivos abiertos en atmósferas totalmente anóxicas (Figura 6.26*b*).

Formas tóxicas del oxígeno

El oxígeno es un poderoso oxidante y un excelente aceptor de electrones en la respiración (*véase* Sección 5.11). El oxígeno



Deborah O. Jung y M. T. Madigan

Coy Laboratory Products

Figura 6.26 Incubación en condiciones anóxicas. (a) Jarra anóxica. Una reacción química producida por el sobre en el interior de la jarra genera $H_2 + CO_2$. El H_2 reacciona con el O_2 presente en la jarra sobre la superficie de un catalizador de paladio para formar H_2O_2. La atmósfera final contiene N_2, H_2 y CO_2. (b) Cámara anóxica con guantes para manipular e incubar cultivos en condiciones anóxicas. La compuerta de la derecha, que puede vaciarse y llenarse con gas libre de O_2, permite introducir o extraer materiales de la cámara con guantes.

en su estado basal normal se llama **triplete de oxígeno ($^3O_2$)**. Sin embargo, una forma tóxica importante del oxígeno es el denominado **singlete de oxígeno ($^1O_2$)**, una forma mucho más energética en la que la capa electrónica externa que rodea al núcleo es muy reactiva y capaz de llevar a cabo espontáneamente una variedad de oxidaciones indeseables para la célula. El singlete de oxígeno se produce tanto fotoquímicamente como bioquímicamente, en este último caso a través de la acción de varias enzimas llamadas peroxidasas. Los organismos que frecuentemente se encuentran con singletes de oxígeno, como las bacterias del aire y los microorganismos fototróficos, a menudo contienen pigmentos llamados **carotenoides** cuya función es convertir los singletes de oxígeno en formas no tóxicas (*véase* Sección 17.3).

Otras formas altamente tóxicas del oxígeno son el **anión superóxido (O_2^-)**, el **peróxido de hidrógeno (H_2O_2)** y el **radical hidroxilo (OH·)**, cada uno de los cuales se produce como un producto lateral durante la reducción de O_2 a H_2O en la respiración (Figura 6.27). Además, las flavoproteínas, quinonas, tioles, y proteínas con hierro y azufre (*véase* Sección 5.11) también pueden llevar acabo la reducción de O_2 a O_2^-. El superóxido es muy reactivo y puede oxidar prácticamente cualquier compuesto orgánico de la célula, como las macromoléculas. Los peróxidos como el H_2O_2 pueden dañar los componentes celulares, pero generalmente no son tan tóxicos para la célula como el anión superóxido o los radicales hidroxilo. Estos últimos son los más reactivos de todas las especies tóxicas del oxígeno y pueden oxidar instantáneamente cualquier sustancia orgánica de la célula. Sin embargo, en la mayoría de las células, los radicales hidroxilo son sólo formas transitorias, porque la fuente principal de OH· son las radiaciones ionizantes a las que las células normalmente no se encuentran expuestas. También se pueden formar pequeñas cantidades de OH· a partir de H_2O_2 (Figura 6.27), pero como los peróxidos no se acumulan en la célula (debido a la acción de la catalasa que consideraremos más tarde) esta fuente de radicales hidroxilo prácticamente se elimina. Más adelante veremos que algunas células del sistema inmunitario de los animales pueden producir varias especies tóxicas de oxígeno y utilizarlas para destruir a los invasores microbianos (*véase* Sección 22.2).

Enzimas que destruyen formas tóxicas de oxígeno

Con tantas formas tóxicas derivadas del oxígeno, no resulta sorprendente que los organismos hayan desarrollado enzimas para destruir estos productos tóxicos (Figura 6.28). La enzima más común de este grupo es la **catalasa**, que ataca al peróxido de hidrógeno y cuya actividad se esquematiza en la Figura 6.28*a* y 6.29. Otra enzima que destruye el peróxido de hidrógeno es la **peroxidasa** (Figura 6.28*b*); difiere de la catalasa en que requiere un reductor, normalmente NADH, para originar H_2O como producto. El superóxido es destruido por la enzima **superóxido dismutasa** (Figura 6.28*c*), que combina dos moléculas de superóxido para formar una molécula de peróxido de hidrógeno y una molécula de oxígeno. Por tanto, la función conjunta de la superóxido dismutasa y de la catalasa puede convertir otra vez el superóxido en oxígeno (Figura 6.28*d*).

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^- \quad \textbf{Superóxido}$$
$$O_2^- + e^- + 2\,H^+ \rightarrow H_2O_2 \quad \textbf{Peróxido de hidrógeno}$$
$$H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow H_2O + OH\bullet \quad \textbf{Radical hidroxilo}$$
$$OH\bullet + e^- + H^+ \rightarrow H_2O \quad \textbf{Agua}$$

$$\boxed{\textbf{Total: } O_2 + 4\,e^- + 4\,H^+ \rightarrow 2\,H_2O}$$

Figura 6.27 Reducción del O_2 hasta agua por la adición secuencial de cuatro electrones. Los intermediarios que se forman son reactivos y tóxicos para la célula.

***(a)* Catalasa:**
$$H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2\,H_2O + O_2$$

***(b)* Peroxidasa:**
$$H_2O_2 + NADH + H^+ \rightarrow 2\,H_2O + NAD^+$$

***(c)* Superóxido dismutasa:**
$$O_2^- + O_2^- + 2\,H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

***(d)* Superóxido dismutasa/catalasa en combinación:**
$$4\,O_2^- + 4\,H^+ \rightarrow 2\,H_2O + 3\,O_2$$

***(e)* Superóxido reductasa:**
$$O_2^- + 2\,H^+ + \text{cit } c_{\text{reducido}} \rightarrow H_2O_2 + \text{cit } c_{\text{oxidado}}$$

Figura 6.28 Enzimas que destruyen especies tóxicas del oxígeno. Las catalasas (a) y las peroxidasas (b) son proteínas que contienen porfirinas, aunque también algunas flavoproteínas pueden consumir especies tóxicas de oxígeno. (c) Las superóxido dismutasas son proteínas que contienen metales, fundamentalmente cobre y zinc, manganeso o hierro. (d) Reacción combinada de la superóxido dismutasa y la catalasa. (e) La superóxido reductasa cataliza la reducción por un electrón de O_2^- a H_2O_2 utilizando citocromo c reducido como donador de electrones.

Los aerobios y los aerobios facultativos contienen por lo general tanto superóxido dismutasa como catalasa, aun-

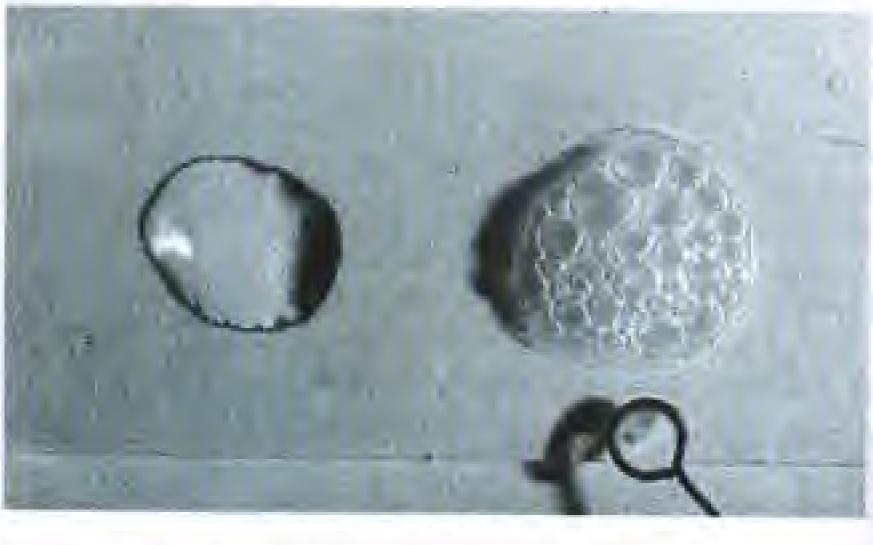

T. D. Brock

Figura 6.29 Método de ensayo de la presencia de catalasa en un cultivo microbiano. Un asa de cultivo cargada con células recogidas de la superficie de un cultivo sólido se mezcla con una gota de agua oxigenada al 30% sobre un portaobjetos. La inmediata aparición de burbujas indica la presencia de catalasa. Las burbujas proceden del O_2 generado en la reacción $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2\,H_2O + O_2$.

que algunos aerobios estrictos carecen de catalasa. La superóxido dismutasa es imprescindible en las células aeróbicas y su ausencia en los anaerobios estrictos parece ser la causa por la que el oxígeno sea tóxico para estas células (*véase* también a este respecto el párrafo siguiente). Algunos anaerobios aerotolerantes, como las bacterias del ácido láctico, carecen también de la superóxido dismutasa pero usan complejos no proteicos de Mn^{2+} libre para lograr la dismutación de O_2^- a H_2O_2 y O_2. Tal reacción puede haber funcionado como una forma primitiva de superóxido dismutasa en los organismos primigenios. Esta idea se basa en el hecho de que todas las superóxido dismutasas conocidas contienen un cofactor metálico en sus centros activos, normalmente Mn^{2+}, pero también Fe^{2+} o Cu^{2+} y Zn^{2+}.

En algunos procariotas anaeróbicos estrictos, se ha descubierto un mecanismo muy interesante de eliminación del anión superóxido. Por ejemplo, en *Pyrococcus furiosus*, un miembro de *Archaea*, no existe superóxido dismutasa pero está presente una enzima particular, la *superóxido reductasa*, que se encarga de la eliminación del superóxido. A diferencia de la superóxido dismutasa, la superóxido reductasa reduce el anión superóxido a H_2O_2 *sin* la producción de O_2 (Figura 6.28*e*). *P. furiosus* también carece de catalasa, una enzima que como la superóxido dismutasa genera O_2 (Figura 6.28*a*). En este microorganismo, el H_2O_2 producido por la superóxido reductasa se elimina por la actividad de enzimas semejantes a las peroxidasas que dan H_2O como producto final (Figura 6.28*b*). La superóxido reductasa puede tener una amplia distribución entre los anaerobios estrictos, ya que diversos estudios de secuenciación del genoma han puesto de manifiesto la presencia de genes semejantes al de la superóxido reductasa en otros anaerobios estrictos. Si esto fuera así, significaría que estos microorganismos, que se pensaba que eran anaerobios estrictos por carecer de superóxido dismutasa, tienen un mecanismo para desechar el anión superóxido altamente tóxico.

✓ *6.13 Revisión de conceptos*

Los aerobios necesitan oxígeno para vivir mientras que los anaerobios no, e incluso pueden morir en su presencia. En la célula se pueden originar varias formas tóxicas del oxígeno, pero existen enzimas que pueden neutralizar la mayor parte de ellas. Se requieren métodos especiales para cultivar bacterias aerobias o anaerobias estrictas.

✓ ¿Qué es un *aerobio facultativo*?

✓ ¿Cómo funciona un agente reductor?

✓ ¿Cómo protege la superóxido dismutasa a la célula?

✓ ¿En qué se diferencia la actividad de la superóxido *dismutasa* de la superóxido *reductasa*?

Preguntas de repaso

1. Describa el proceso molecular clave que ocurre cuando una célula crece y se divide en dos. ¿Qué proteínas intervienen en este proceso de división celular?
2. En el bacilo *Escherichia coli*, ¿en qué se diferencian al microscopio las células mutadas en el gen que codifica la proteína MreB de las células del tipo silvestre (no mutadas)? Razone la respuesta.
3. ¿Por qué el antibiótico penicilina mata las células bacterianas?
4. ¿Cuál es la diferencia entre la constante de la velocidad de crecimiento (k) de un organismo y su tiempo de generación (g)?
5. ¿Por qué es útil representar los datos del crecimiento de un cultivo?
6. Describa el ciclo de crecimiento de una población de células bacterianas desde el momento en que se inocula en medio fresco. ¿En qué puede diferir el modelo de crecimiento si el crecimiento se mide en células totales o en células viables?
7. Describa un método directo y otro indirecto para medir el crecimiento bacteriano. Confirme que los métodos elegidos concuerdan con su definición.
8. Describa brevemente el proceso por el que una célula aislada se convierte en colonia visible en una placa . Teniendo en cuenta su explicación, describa el principio en el que se basa el método de recuento de células viables.
9. ¿Cómo puede el quimiostato regular independientemente la velocidad de crecimiento y el número de células?
10. Examine la gráfica que relaciona la velocidad de crecimiento y la temperatura (Figura 6.17). En términos bioquímicos, explique por qué la temperatura óptima para un organismo está normalmente más cercana a su temperatura máxima que a su mínima.
11. Con respecto al pH del medio y el de la célula, ¿en qué son diferentes los acidófilos de los alcalófilos? ¿En qué son iguales?
12. Explique en términos moleculares cómo una célula de un halófilo es capaz de hacer que las moléculas de agua entren en su interior.
13. Cite tres *tipos químicos* de solutos compatibles producidos por diferentes microorganismos. Cite al menos dos cosas que todos ellos tengan en común.
14. Compare un aerotolerante y un anaerobio estricto en lo que respecta a sensibilidad y crecimiento en presencia de oxígeno (O_2). ¿En qué difiere un anaerobio aerotolerante de un microaerófilo?
15. Compare las enzimas *catalasa*, *superóxido dismutasa*, y *superóxido reductasa* desde los siguientes puntos de vista: sustratos, productos de oxígeno, organismos que los presentan y función en la tolerancia celular al oxígeno de la célula.

Ejercicios prácticos

1. Un cultivo en medio nutritivo rico se inicia con cuatro células bacterianas por mililitro, y presenta un periodo de latencia de 1 hora y un tiempo de generación de 20 minutos, ¿cuántas células habrá en 1 litro de ese cultivo tras 1 hora de incubación? ¿Y tras 2 horas? ¿Y tras 2 horas si una de las células del inóculo inicial estuviera muerta?
2. Calcule el valor de g y de k en un experimento de crecimiento en el que se inoculó un medio con 5×10^6 células/ml de *Escherichia coli* y que, después de un periodo de latencia de 1 hora, creció exponencialmente durante 5 horas alcanzando una población de $5{,}4 \times 10^9$ células/ml.
3. Consulte el Capítulo 3 y localice una figura que describa lo que sucede a las enzimas de un mesófilo como *Escherichia coli* cuando se coloca en un medio de cultivo a 80°C. Compare esto con una figura del Capítulo 6 que describa qué ocurriría si una célula de *Pyrolobus fumarii* se colocara en las mismas condiciones. Describa por qué ninguno de los dos organismos crecería.
4. ¿Es probable encontrar vivo a un microorganismo psicrófilo en una fuente termal? ¿Porqué? Con frecuencia es posible aislar microorganismos termófilos de ambientes de agua fría. Explique estos hechos.

El material genético de todas las células es ácido desoxirribonucleico bicatenario (DNA), cuya estructura molecular se muestra en esta página. Para que un organismo crezca y se reproduzca, la información genética codificada en la doble hélice debe replicarse con precisión y usarse para producir moléculas específicas de ácido ribonucleico (RNA) y proteína. Los procesos utilizados para llevar a cabo estas funciones se descubrieron en microorganismos, pero los mecanismos básicos son muy similares en todos los organismos celulares, de las bacterias al hombre

7

PRINCIPIOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR MICROBIANA

I GENERALIDADES SOBRE GENES Y EXPRESIÓN GÉNICA 168
7.1 Macromoléculas e información genética 169

II ESTRUCTURA DEL DNA 171
7.2 Estructura del DNA: la doble hélice 171
7.3 Estructura del DNA: superenrollamiento 174
7.4 Elementos genéticos 177

III REPLICACIÓN DEL DNA 180
7.5 Replicación del DNA: moldes e iniciadores 180
7.6 Replicación del DNA: la horquilla de replicación 181
7.7 Replicación del DNA: elementos genéticos lineales 185

IV SÍNTESIS Y PROCESAMIENTO DEL RNA 187
7.8 Generalidades sobre la transcripción 187
7.9 Promotores 189
7.10 Terminadores de la transcripción 190
7.11 La unidad de transcripción 191
7.12 Procesamiento del RNA y ribozimas 192

V SÍNTESIS DE PROTEÍNAS 194
7.13 El código genético 194
7.14 RNA de transferencia 197
7.15 Traducción: el proceso de la síntesis de proteínas 200
7.16 Plegamiento y secreción de proteínas 203

Glosario

Aminoacil-tRNA sintetasas un grupo de enzimas cada una de las cuales cataliza la unión del aminoácido correcto a un tRNA

Anticodón una secuencia de tres bases en una molécula de tRNA que aparea con un codón durante la síntesis de proteínas

Antiparalelo en relación al DNA bicatenario, una cadena va en la dirección 5′ → 3′ y la otra en la dirección 3′ → 5′

Codón una secuencia de tres bases en el mRNA que codifica un aminoácido

Cromosoma un elemento genético, generalmente circular en procariotas y lineal en eucariotas, que lleva genes esenciales para el funcionamiento de la célula

Chaperones moleculares grupo de proteínas que ayuda a otras proteínas a plegarse o replegarse a partir de un estado desnaturalizado

DNA polimerasa una enzima que sintetiza una nueva cadena de DNA en la dirección 5′ → 3′ usando una cadena antiparalela de DNA como molde

Exón la secuencia codificante de un gen (lo contrario que un intrón)

Gen un segmento de DNA que codifica para una proteína (vía mRNA), un tRNA o un rRNA

Genoma el conjunto de genes contenido en una célula o un virus

Iniciador una molécula (generalmente un polinucleótido) al cual la DNA polimerasa puede unir el primer desoxirribonucleótido nucleótido durante la replicación del DNA

Intrón las secuencias no codificantes que separan los exones en un gen partido

Operón una agrupación de genes cuya expresión es controlada por un único operador

Procesamiento de RNA conversión de un RNA precursor a su forma madura

Promotor un sitio en el DNA al cual puede unirse la RNA polimerasa y comenzar la transcripción

Replicación síntesis de DNA utilizando DNA como molde o templado

Replicación semiconservativa Síntesis de DNA que origina nuevas dobles hélices, cada una formada por una cadena parental y otra de nueva síntesis

Ribosoma una partícula citoplásmica compuesta de RNA ribosómico y proteína, la cual es parte central de la maquinaria sintetizadora de proteínas de la célula

Ribozima una molécula de RNA que puede catalizar reacciones químicas

RNA de transferencia (tRNA) una molécula adaptadora utilizada en la traducción que tiene especificidad por un determinado aminoácido y por uno o más codones

RNA mensajero (mRNA) una molécula de RNA que contiene la información necesaria para codificar para una proteína

RNA polimerasa una enzima que sintetiza RNA en la dirección 5′ → 3′ usando una cadena antiparalela de DNA como templado

RNA ribosómico (rRNA) tipos de RNA encontrados en el ribosoma; algunos participan activamente en el proceso de la síntesis de proteínas

Traducción síntesis de proteínas utilizando la información genética presente en un RNA mensajero

Transcripción síntesis de RNA usando un DNA como molde

Transcrito primario una molécula de RNA no procesado que es el producto directo de la transcripción

El término *biología molecular* se aplica específicamente al estudio de la estructura y función del conjunto de **macromoléculas** que se encuentran en las células vivas. Este capítulo examina solamente las moléculas que están directamente implicadas en la transmisión de la información en microorganismos.

En el Capítulo 1, consideramos las células como «máquinas químicas» y «sistemas codificadores». En el Capítulo 3, examinamos la estructura básica de las macromoléculas celulares. En el presente capítulo, se explica cómo las células guardan la información genética y los mecanismos que usan para procesar y usar esta información. En el capítulo siguiente describiremos cómo se regula la expresión de la información genética. Los capítulos posteriores abordarán la información genética de algunas formas no celulares, la transferencia de la información genética y cómo la información genética puede manipularse.

I GENERALIDADES SOBRE GENES Y EXPRESIÓN GÉNICA

La **genética** es la disciplina que trata de los mecanismos por los cuales los caracteres se transmiten de un organismo a otro y cómo se expresan. Puesto que la transmisión de la información biológica es la base de la función celular, la genética es una herramienta de primera magnitud. Acoplada con la biología molecular permite entender los mecanismos moleculares que permiten que la célula funcione. El estudio de la genética desde la perspectiva molecular también es fundamental para entender la variabilidad de los organismos y la evolución de las especies.

La comprensión de cómo la información se transmite a través de los sistemas biológicos tiene enormes aplicaciones prácticas. Por ejemplo, la genética nos proporciona técnicas que permiten modificar específicamente a los organismos. Muchos de los recientes avances en agricultura, industria y medicina se basan en la genética y la biología molecular. La comprensión de la transmisión biológica en una célula no sólo permite entender el funcionamiento en el organismo normal, sino también cómo estas funciones se alteran en el organismo enfermo. Con este conocimiento, los científicos están desarrollando no sólo métodos para controlar importantes enfermedades infecciosas, sino también soluciones para alteraciones metabólicas que se creían incurables. En capítulos posteriores profundizaremos en la aplicación de la genética (incluyendo la genética de microorganismos) en el ámbito humano.

7.1 Macromoléculas e información genética

Muchas de las moléculas implicadas en la transmisión de la información genética son **macromoléculas**. Antes de que conociéramos su naturaleza, o incluso las etapas de dicha transmisión, estaba claro que existía una unidad de información genética. Esta unidad se denomina **gen**.

¿Qué es un gen y cuál es su función?

La mayoría de los genes son entidades que codifican la estructura de un único polipéptido o *proteína*. Ya comentamos la química de las proteínas en el Capítulo 3 y constatamos que estaban formadas por una o más cadenas polipeptídicas. Un polipéptido se compone de una serie de aminoácidos unidos por un enlace peptídico. Existen unos 20 aminoácidos diferentes presentes en las proteínas (*véase* Figura 3.12), y una única molécula de proteína normalmente tiene varios cientos de aminoácidos (*véanse* Secciones 3.6-3.8). El gen es el elemento de información que codifica la *secuencia* de aminoácidos de la proteína. Los genes son los almacenes de la información, mientras que las proteínas son las entidades funcionales.

En todas las células los genes están compuestos de *ácido desoxirribonucleico* (DNA). La información del gen está contenida en la secuencia de bases del DNA. La información guardada en el DNA codifica la secuencia de una proteína, y lo hace exclusivamente a través de una molécula intermediaria, el *ácido ribonucleico* (RNA). Dado que las tres clases de macromoléculas, DNA, RNA y proteína, contienen la información biológica en sus secuencias, frecuentemente se denominan **macromoléculas que llevan información** (*véase* Sección 3.2).

En el DNA y el RNA, la información está codificada en la *secuencia de bases* púricas y pirimídicas de la cadena polinucleotídica. Cuando tratemos del contenido de información de un ácido nucleico, hablaremos de las propiedades codificantes de este material. La secuencia de aminoácidos de un polipéptido está *codificada* por la secuencia de las bases púricas y pirimídicas del ácido nucleico. En este capítulo comentaremos la función codificadora en detalle.

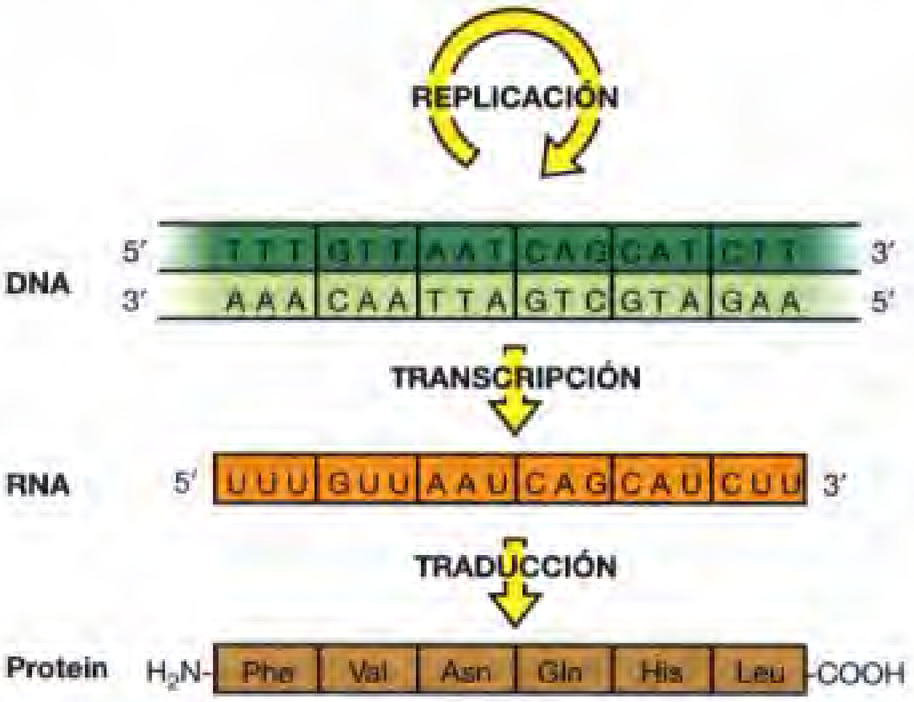


Figura 7.1 Síntesis de los tres tipos de moléculas informacionales. Nótese que en cualquier región particular, sólo se transcribe una de las dos cadenas de la doble hélice de DNA.

Etapas de la transmisión de la información

Los procesos moleculares implicados en la transmisión de la información genética pueden dividirse en las tres fases que resumimos brevemente a continuación (Figura 7.1).

1. *Replicación*. La molécula de DNA, que actúa como el material genético de la célula, es una **doble hélice** de dos largas cadenas (*véase* Sección 3.5). Durante la replicación, el DNA se duplica produciendo dos hélices dobles.
2. *Transcripción*. El DNA no participa directamente en la síntesis de proteínas sino que lo hace a través de un intermediario de RNA. La transferencia de la información al RNA se denomina **transcripción**, y la molécula de RNA que lleva la información que codifica una proteína se denomina **RNA mensajero** (mRNA). En la mayoría de los casos, para un segmento particular del cromosoma sólo se transcribe una de las cadenas del DNA (Figura 7.1). Algunas regiones del DNA que se transcriben no codifican proteínas, sino que contienen la información para otros tipos de RNA, tales como **RNA de transferencia** (tRNA) y **RNA ribosómico** (rRNA). Así, debemos ampliar nuestra definición de gen para incluir regiones del DNA que codifican estos tipos de RNA.
3. *Traducción*. La secuencia específica de aminoácidos en cada proteína está determinada por una secuencia específica de bases en el mRNA (que se transcribe a su vez a partir del DNA). Existe una correspondencia lineal entre la secuencia de bases de un gen y la secuencia de aminoácidos de un polipéptido (Figura 7.1). Se necesitan *tres* bases del mRNA para codificar un solo aminoácido y cada uno de estos tripletes se denomina **codón**. Este **código genético** se traduce a proteína por medio de la maquinaria para síntesis de proteínas. Este sistema consta de **ribosomas** (compuestos a su vez de proteínas y rRNA), tRNA y varias enzimas.

En el proceso de replicación, transcripción y traducción, la información en la secuencia del ácido nucleico puede codificar bien la secuencia de otro ácido nucleico o de una proteína. Sin embargo, la transferencia de la información desde el ácido nucleico a la proteína es unidireccional; la secuencia de la proteína **no** indica la secuencia del ácido nucleico. Esta transferencia unidireccional de información desde el ácido nucleico a la proteína se conoce como *dogma central de la biología* porque es compartida por todas las formas de vida de nuestro planeta.

Las tres etapas de la transferencia mostradas en la Figura 7.1 son las que usan todas las células. En el Capítulo 9, veremos que la transferencia de la información durante la reproducción de algunos virus puede implicar dos tipos diferentes de transferencia. Una es la *replicación del RNA*, en la cual el RNA se utiliza como molde para la síntesis de RNA. El otro es la *transcripción inversa* (*reversa*), en la que se usa una información contenida en una secuencia de RNA para originar una secuencia en forma de DNA. Nótese que en ambos casos la transferencia de información es de ácido nucleico a ácido nucleico y, por tanto, no contradice el dogma central.

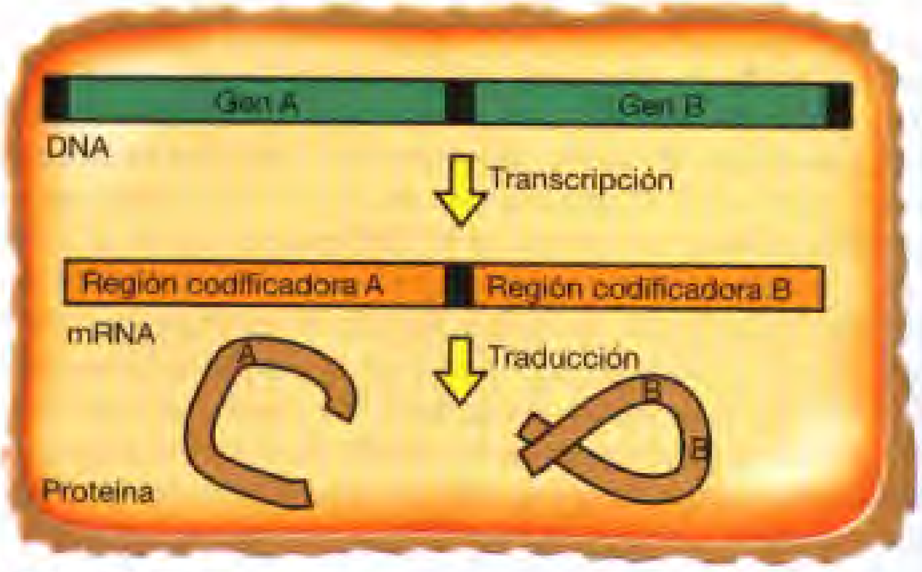
Genética de procariotas y eucariotas

Los procesos de replicación, transcripción y traducción se producen en todos los organismos celulares. Sin embargo, existen diferencias en los mecanismos utilizados en procariotas y en eucariotas. Esto es debido, en parte, a diferencias en la organización de la información genética y al hecho de que los eucariotas poseen un núcleo.

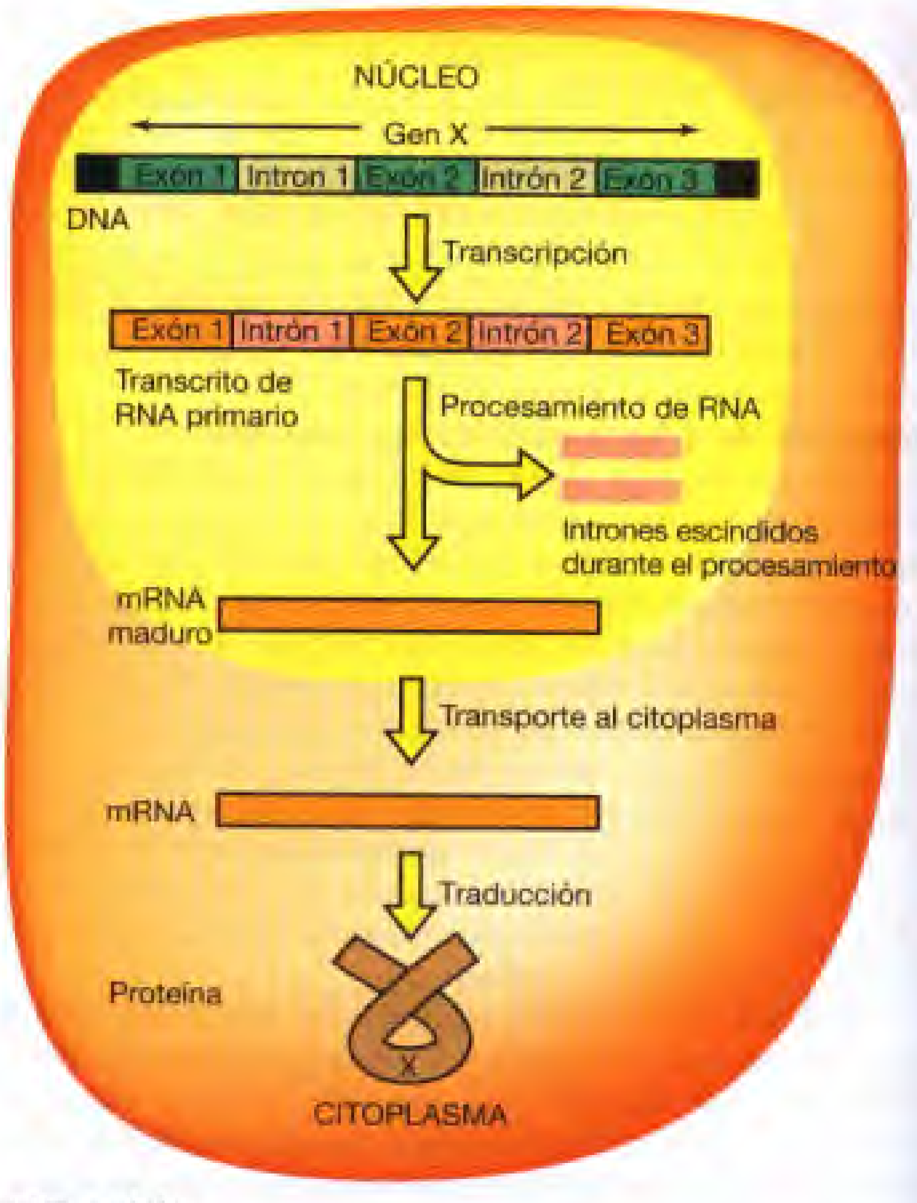
Ya señalamos en el Capítulo 2 las diferencias básicas en la organización del DNA en procariotas y eucariotas. En resumen, el genoma procariótico está representado (en general) por una única molécula *circular* de DNA covalentemente cerrada que se encuentra en el citoplasma de la célula, y el genoma de eucariotas está constituido por varias piezas *lineales* de DNA presente en cromosomas individuales en el núcleo de la célula.

En procariotas no hay una membrana que separe el cromosoma del citoplasma (*véase* Sección 2.2). En eucariotas, sin embargo, los cromosomas están localizados dentro del núcleo y los ribosomas en el citoplasma, de manera que la transcripción y la traducción están espacialmente separadas.

En todos los tipos de células la definición de un gen es la misma: un segmento de DNA que codifica una proteína (vía mRNA), un tRNA o un rRNA. Sin embargo, en eucariotas los genes que codifican proteínas están frecuentemente divididos en dos o tres regiones codificadoras separadas por regiones no codificadoras. Las regiones codificadoras se denominan exones, y las regiones separadoras intrones. Ambas regiones, exones e intrones, se transcriben para formar un **transcrito primario** o **pre-RNA**, formándose posteriormente el RNA funcional por eliminación de los intrones. En la Figura 7.2, se presenta una comparación esquemática de los fenómenos genéticos que diferencian a procariotas de eucariotas.



(a) **Procariota**



(b) **Eucariota**

Figura 7.2 Comparación de la transferencia de información genética en procariotas y eucariotas. (a) Procariotas. Una única molécula de RNA contiene a menudo más de una región codificadora (tal mRNA se llama *policistrónico*). (b) Eucariotas. Las regiones no codificantes (*intrones*) se eliminan del transcrito primario antes de la traducción. Los mRNAs de los eucariotas son casi siempre *monocistrónicos*. Nótense que los dos tipos de células no están dibujadas a escala. Una célula procariótica típica suele medir de 1 a 2 µm de diámetro y una célula eucariótica típica (animal) mide alrededor de 25 µm de odiámetro (véase Figura 2.3).

✓ 7.1 Revisión de conceptos

Los tres procesos clave de la síntesis de macromoléculas son la replicación del DNA, transcripción (síntesis de RNA a partir de un DNA molde) y traducción (síntesis de proteínas utilizando el RNA mensajero como molde). Aunque los procesos básicos son los mismos en procariotas y eucariotas, la organización de la información genética es más compleja en eucariotas. Muchos genes de eucariotas tienen regiones codificadoras (exones) y no codificadoras (intrones).

- ✓ ¿Qué tres tipos de moléculas están implicadas en la transmisión de la información genética?
- ✓ En todas las células hay tres procesos implicados en la transmisión de información genética. ¿Cuáles son?

II ESTRUCTURA DEL DNA

En el Capítulo 3, se estudió la estructura general de los ácidos nucleicos. En las siguientes secciones se tratarán los detalles de la estructura del DNA necesarios para entender la genética molecular y los tipos de elementos genéticos celulares constituidos por DNA. Con esta información básica, estaremos en condiciones de entender cómo el DNA se replica, se transcribe a RNA y se traduce a proteína.

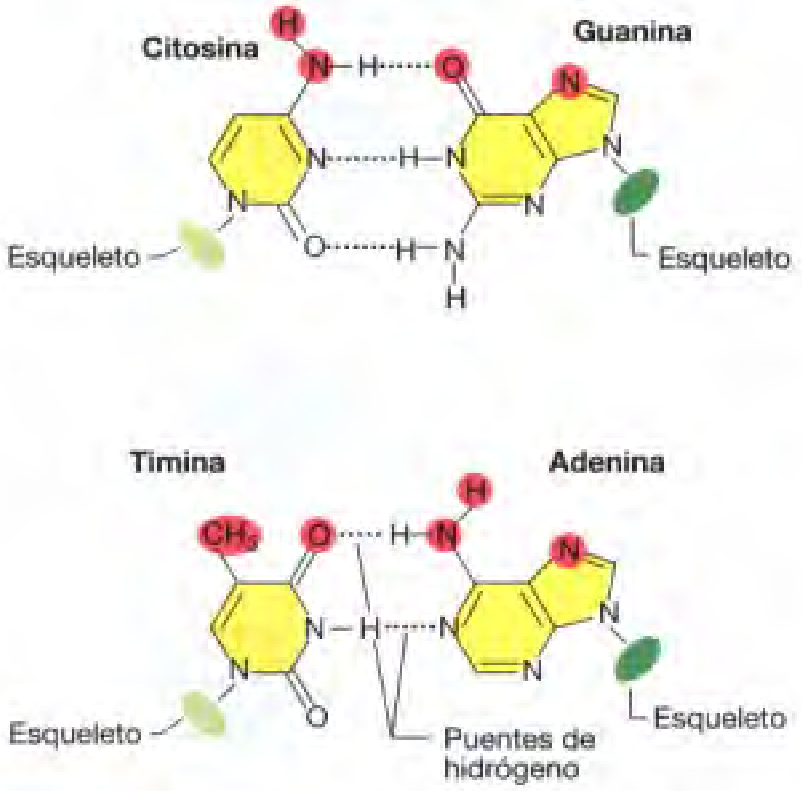


Figura 7.3 Apareamiento específico entre la adenina (A) y la timina (T) y entre la guanina (G) y la citosina (C) mediante puentes de hidrógeno. Estos dos pares de bases son los típicos de los DNA bicatenarios. Los átomos que se encuentran en el surco principal de la doble hélice y que interactúan con proteínas se resaltan en rojo. También se indican los esqueletos de desoxirribosa fosfato de las dos cadenas del DNA.

7.2 Estructura del DNA: la doble hélice

La información genética para todos los procesos celulares se guarda en el DNA en forma de la *secuencia* de bases de la cadena polinucleotídica. Como se ha indicado, en el DNA sólo hay cuatro bases diferentes: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). Como se muestra en la Figura 3.11, el esqueleto de la cadena de DNA está formado por unidades de fosfato y del azúcar *desoxirribosa* alternando entre sí. Unida a cada azúcar existe una de las bases mencionadas. Debe recordarse el sistema de numeración para las posiciones del azúcar y de la base; el fosfato que conecta dos azúcares va desde el carbono 3′ de un azúcar al carbono 5′ del azúcar adyacente (*véase* Figura 7.14). En un extremo de la molécula del DNA, el azúcar tiene un fosfato en el hidroxilo 5′ mientras que en el otro el azúcar tiene un hidroxilo libre en la posición 3′.

El DNA como una doble hélice

Como se verá en el Capítulo 9, los cromosomas de algunos virus son de cadena sencilla. Sin embargo, en los **cromosomas de todos los organismos celulares**, el DNA existe en forma de dos cadenas polinucleotídicas cuya secuencia de bases es **complementaria**. La complementariedad de las bases surge de la especificidad del apareamiento de las bases púricas y pirimídicas: la adenina se aparea siempre con la timina, y la guanina con la citosina (Figura 7.3). Las dos cadenas de la **doble hélice** resultante están ordenadas de manera *antiparalela* (*véase* Figura 7.4). Esto significa que las dos cadenas están orientadas «cabeza-pie». En la Figura 7.4, la cadena de la izquierda está ordenada en la dirección 5′ a 3′ de arriba abajo, mientras que la otra se ordena en la dirección 5′ a 3′ de abajo arriba. Las dos cadenas están enrolladas entre sí formando una doble hélice (Figura 7.5). En esta doble hélice, el DNA forma dos surcos distintos, el mayor y el menor. De las múltiples proteínas que interaccionan específicamente con el DNA (como se verá en el Capítulo 8), la mayoría interaccionan principalmente con el surco mayor, donde existe una cantidad de espacio considerable. Dada la regularidad de la doble hélice, algunos de los átomos de las bases están siempre expuestos en el surco mayor (y algunos en el menor). En la Figura 7.4, se muestran los átomos del surco mayor que son importantes en la interacción con las proteínas.

El tamaño de la molécula de DNA puede expresarse en términos de su *peso molecular*, pero dado que cada nucleótido tiene un peso molecular de 330 y que, por otra parte, las moléculas de DNA tienen muchos nucleótidos, el peso molecular aumenta rápidamente. (El ácido nucleico, incluso el de los virus pequeños, puede tener un peso molecular del orden de millones y el DNA de las células de miles de millones). Una manera más conveniente de expresar los tamaños de las moléculas de DNA es en términos del *número de miles* de bases, o de pares de bases, por molécula. Así, una molécula de DNA con 1000 bases contiene una *kilobase* de DNA. Si la molécula de DNA es una doble hélice,

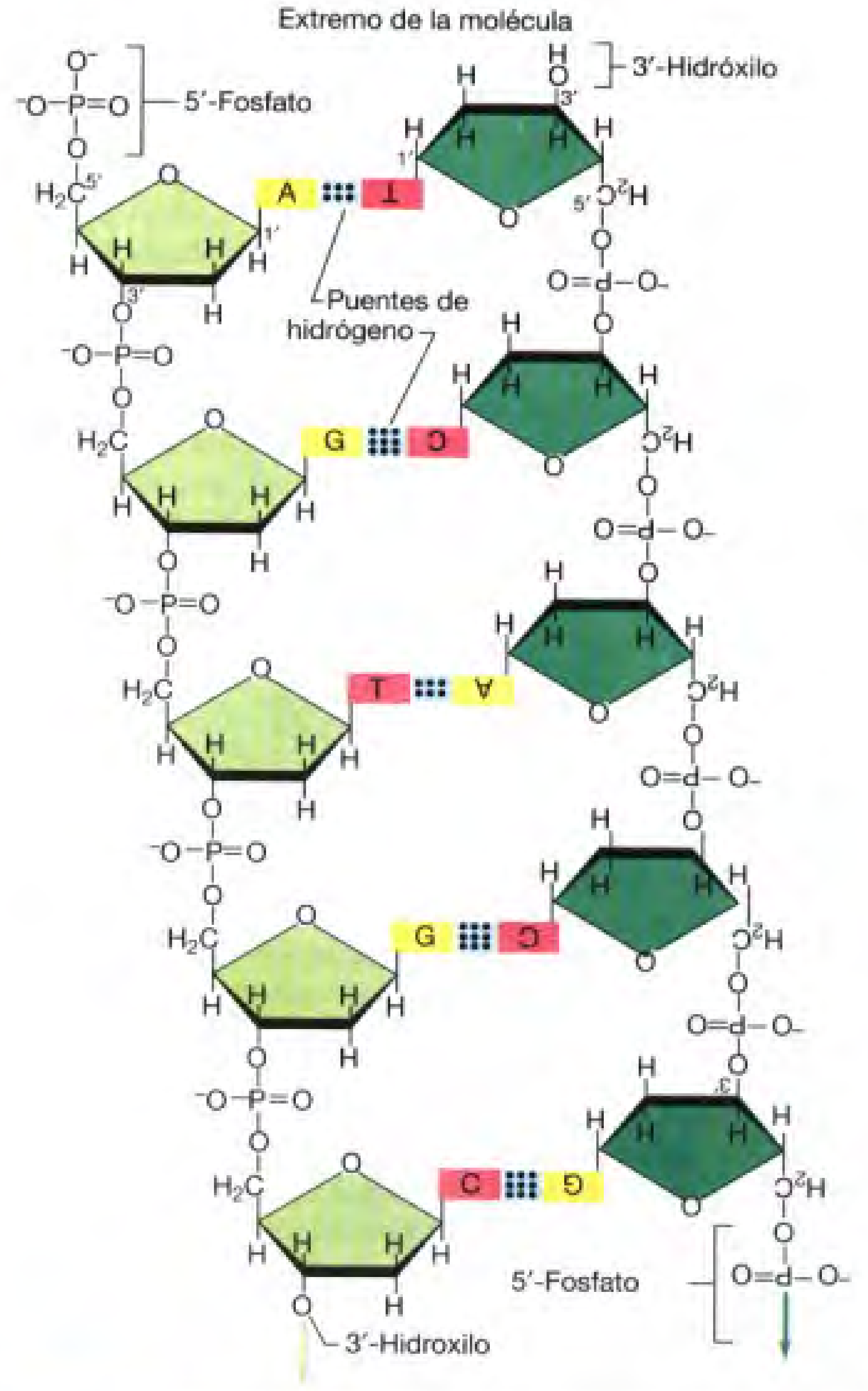
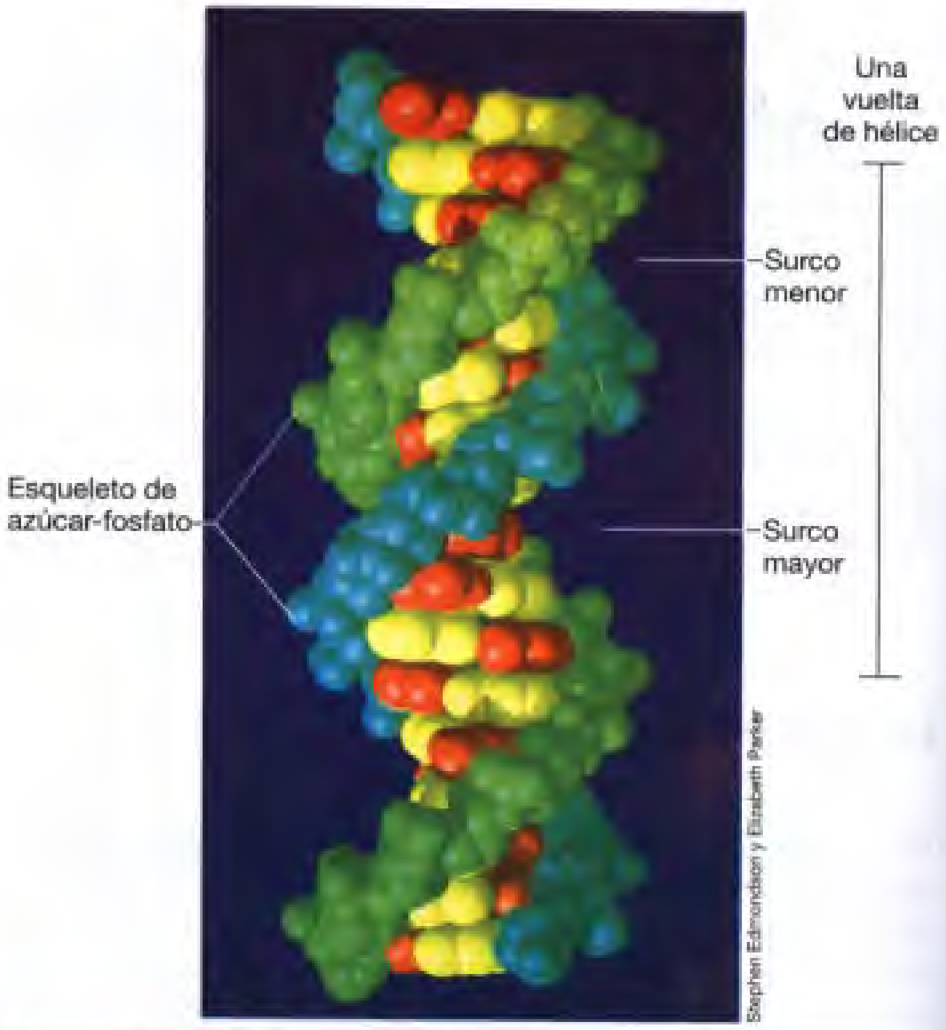


Figura 7.4 Estructura del DNA. Naturaleza complementaria y antiparalela del DNA. Nótese que uno de los extremos de las cadenas terminan en un grupo 5'-fosfato, mientras que el otro extremo es un 3'-hidroxilo. Las bases en rojo representan las pirimidinas citosina (C) y timina (T), y las amarillas representan las bases púricas adenina (A) y guanina (G).

entonces se habla de *kilopares de bases*. Así, una doble hélice de 5000 pares de bases tendría un tamaño de 5 kilopares de bases. La bacteria *Escherichia coli* tiene 4600 kilopares de bases de DNA en su cromosoma. Dada la inmensa cantidad de información de secuencias genómicas que se está acumulando, es frecuentemente útil hablar de *millones* de pares de bases o *megapares de bases*. El genoma de *E. coli* tiene 4.6 megapares de bases.

Cada par de bases comprende 0,34 nanometros (nm) de longitud a lo largo de la hélice, y cada vuelta de la hélice contiene 10 pares de bases. Así, 1 kilobase de DNA tiene 100 vueltas de hélice y una longitud de 0,34 µm. Cálculos de este tipo pueden ser muy interesantes como veremos más adelante.



Stephen Edmondson y Elizabeth Parker

Figura 7.5 Modelo computerizado de un pequeño fragmento de DNA mostrando la configuración de la doble hélice. Uno de los esqueletos azúcar-fosfato se muestra en azul y el otro en verde. Las bases pirimídicas se muestran en rojo y las púricas en amarillo. Nótese la localización de los surcos mayor y menor. El modelo fue generado utilizando un programa del Computer Graphics Laboratory, University de California en San Francisco.

Nótese que a diferencia del peso molecular, que hace referencia a la masa, la medida del ácido nucleico por el número de bases o de pares de bases es una medida de *longitud*. Mientras una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla puede tener menos estructura que una de cadena doble, cada tipo queda mejor descrito por el número de bases en una cadena sencilla. Por tanto, los biólogos moleculares usan la abreviatura kb (kilobase) para describir tanto las moléculas de cadena doble como de cadena sencilla.

Características estructurales del DNA específicas de la secuencia

En las regiones del cromosoma que codifican proteínas, la secuencia del DNA está limitada en gran medida por la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas y por la naturaleza del código genético (*véase* Sección 7.13). Sin embargo, con frecuencia, existen secuencias de bases en el DNA que existen no por sus propiedades codificadoras, sino por su influencia en la *estructura secundaria* del DNA o por el modo en el que el DNA interacciona con proteínas.

Las moléculas largas de DNA son bastante flexibles, pero los segmentos de DNA de menos de 100 pares de bases son mucho más rígidos. Algunos segmentos cortos de DNA pueden ser doblados por proteínas que interaccionan con ellos. Sin embargo, ciertas secuencias por sí mismas originan curvaturas en el DNA. Las secuencias de este **DNA curvado** involucran frecuentemente varios grupos de cinco o seis adeninas (en la misma cadena), separados entre ellos por cuatro o cinco bases. Además, algunas secuencias contribuyen a la capacidad del DNA para doblarse cuando ciertas proteínas interactúan con él. Generalmente, la curvatura del DNA está implicada en la regulación de la expresión génica, como veremos en el Capítulo 8.

En el DNA, con frecuencia se encuentran secuencias cortas repetidas. Muchas proteínas interaccionan con regiones del DNA con secuencias repetidas (*véase* Capítulo 8) pero en orientación inversa. Este tipo de repeticiones se conoce como **repetición invertida**. Las repeticiones invertidas confieren una simetría binaria a la secuencia del DNA. Como se muestra en la Figura 7.6, repeticiones invertidas cercanas teóricamente podrían conducir a la formación de **bucles cruciformes** (bucle en forma de horquilla cruciforme) en el DNA. (Nótese que el tallo del bucle es una doble hélice corta con apareamiento de bases normal y cadenas antiparalelas.)

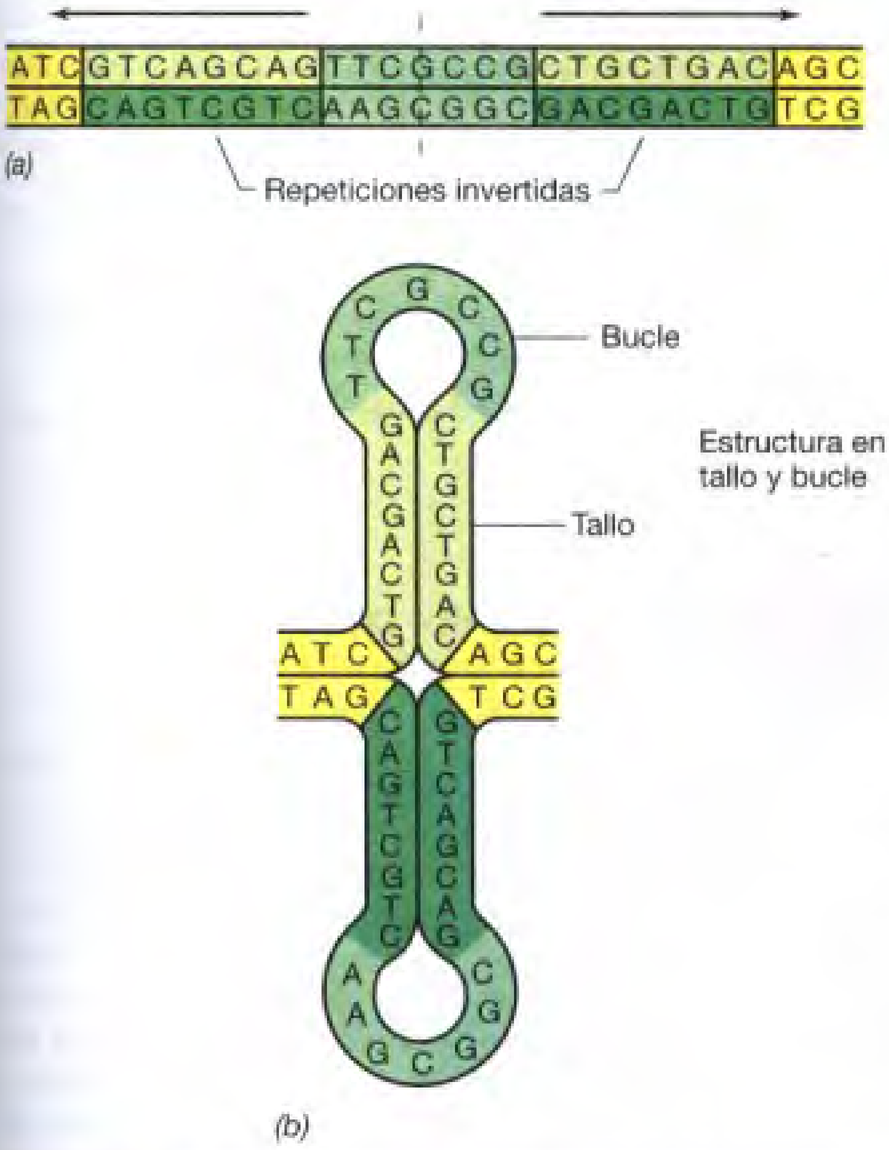

ATC GTCAGCAG TTCGCCG CTGCTGAC AGC
TAG CAGTCGTC AAGCGGC GACGACTG TCG
(a)
Repeticiones invertidas
Bucle
Estructura en tallo y bucle
Tallo
ATC
TAG
AGC
TCG
(b)

Figura 7.6 Repeticiones invertidas y formación de una estructura en bucle con tallo (cruciforme). (a) Repeticiones invertidas próximas en el DNA. Las flechas indican la simetría respecto de un eje imaginario (línea discontinua). (b) Formación de estructuras cruciformes por apareamiento de bases complementarias en la *misma* cadena.

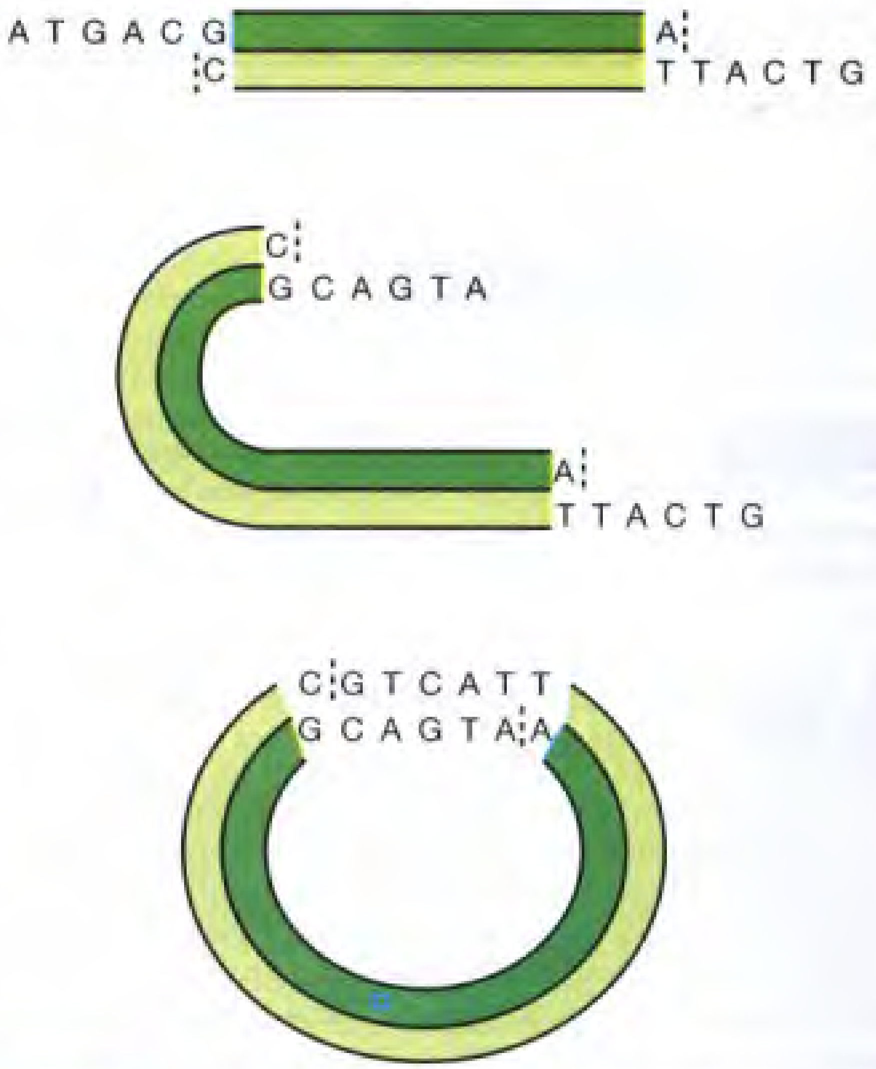


Figura 7.7 DNA lineal con extremos monocatenarios complementarios («extremos cohesivos») que pueden circularizarse por apareamiento de los mismos.

Si se examina la Figura 7.6, se observa que cada cadena de la región mostrada puede formar un bucle. Así, algunas de las repeticiones invertidas del DNA que son transcritas pueden ser importantes debido a los bucles que forman en el RNA. Tal *estructura secundaria* (*véase* Sección 3.5), formada por el apareamiento de las bases de un ácido nucleico de cadena sencilla, es muy importante tanto en el RNA de transferencia (*véase* sección 7.14) como en el RNA ribosómico (*véanse* Sección 11.4 y Figura 11.8).

Los *extremos* de las moléculas lineales de DNA pueden tener también secuencias interesantes que originan cambios en su estructura. Algunas moléculas de DNA tienen regiones de cadena sencilla en sus extremos que son complementarias. Esto sugiere que los dos extremos puedan encontrarse y asociarse por apareamiento de bases, como se ilustra en la Figura 7.7, para formar un círculo. El genoma del virus bacteriano lambda se circulariza de esta manera (*véase* Sección 9.10). El DNA que lleva secuencias complementarias de cadena sencilla en sus extremos se dice que tiene «extremos cohesivos». Algunas moléculas de DNA tienen estructuras en **horquilla** pero casi sin bucle. Las horquillas pueden originarse a partir de una región de cadena sencilla al final de la molécula que contiene una repetición invertida, como se muestra en la Figura 7.8. En la Sección 7.7, se verán otras secuencias importantes en los extremos del DNA lineal del cromosoma eucariótico.

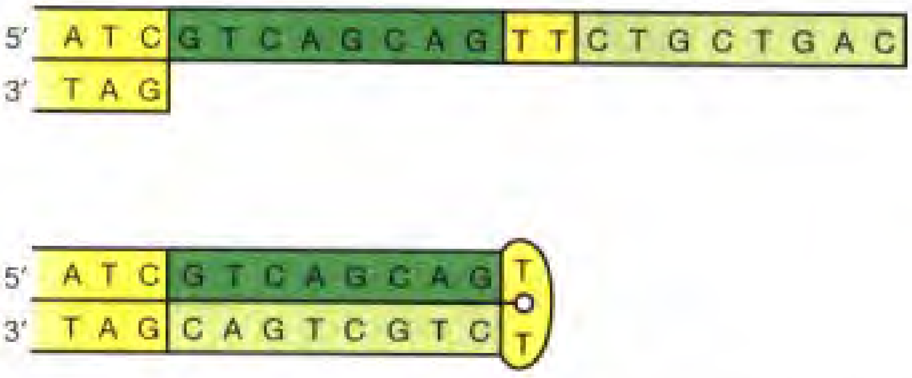

5' A T C G T C A G C A G T T C T G C T G A C
3' T A G
5' A T C G T C A G C A G T
O
3' T A G C A G T C G T C T

Figura 7.8 Una estructura en horquilla en un extremo de una molécula de DNA circular. Si el DNA lineal hubiera sido totalmente bicatenario, las secuencias señaladas en verde habrían sido repeticiones invertidas.

El efecto de la temperatura en la estructura del DNA

Aunque los puentes de hidrógeno entre los pares de bases individualmente son muy débiles (*véase* Sección 3.1), su conjunto mantiene unidas las cadenas de una molécula típica de DNA bicatenario. Puede haber millones e incluso cientos de millones de puentes de hidrógeno, dependiendo del número de pares de bases en la molécula. Recuérdese (Figura 7.3) que cada par adenina-timina tiene dos de estos enlaces, mientras que cada par guanina-citosina tiene tres. Esto hace que los pares GC sean más fuertes que los pares AT .

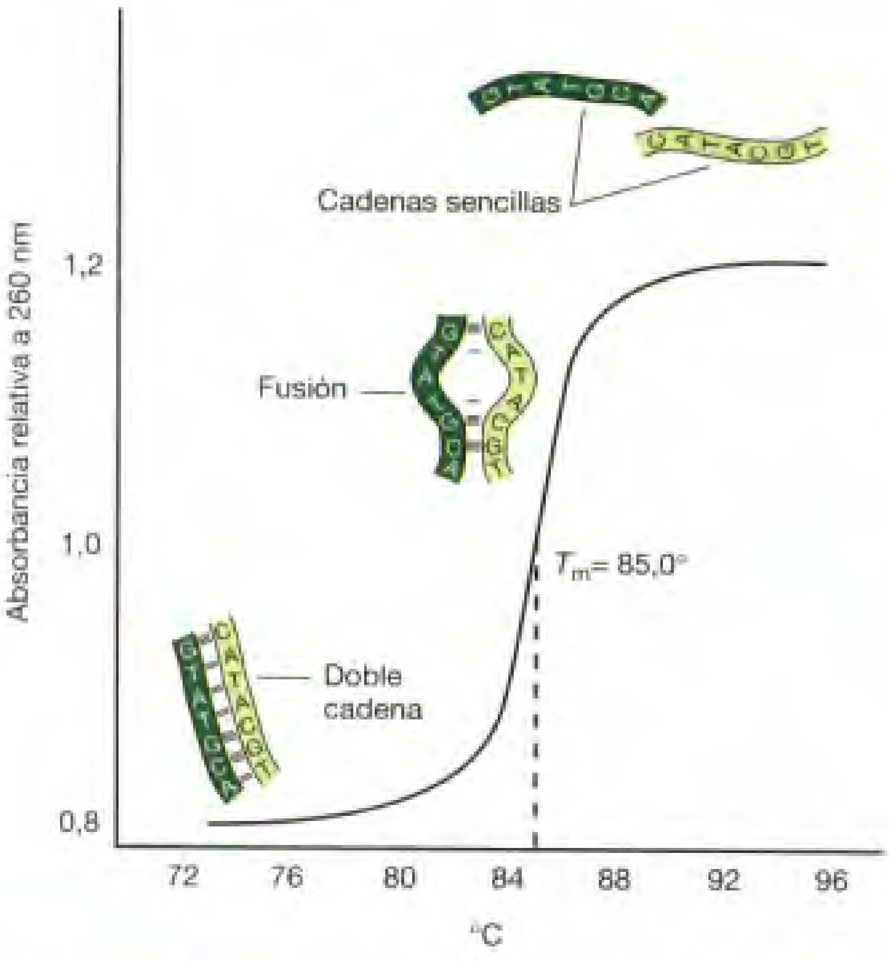


Figura 7.9 Desnaturalización termal del DNA. El DNA absorbe más luz ultravioleta cuando la doble hélice se desnaturaliza. La transición es bastante abrupta, y la temperatura del punto de fusión, T_m, está directamente relacionada con el contenido en GC de ese DNA. Aunque el DNA desnaturalizado puede renaturalizarse por enfriamiento lento, el proceso no sigue una curva similar. La renaturalización es más completa cuanto más se baje la temperatura (por debajo de la de fusión), y sólo después de un tiempo de incubación considerable.

Cuando el DNA se aísla de las células y se guarda a temperaturas cercanas a la temperatura ambiental y en concentraciones fisiológicas de sal, el DNA permanece en la forma de doble cadena. Sin embargo, si se eleva la temperatura los puentes de hidrógeno se rompen, pero no los enlaces covalentes intracatenarios y las cadenas de DNA se separan. Este proceso se denomina *fusión* y puede medirse experimentalmente debido a que las cadenas sencillas y las dobles difieren en su capacidad para absorber la luz ultravioleta de cierta longitud de onda, aunque tengan la misma secuencia (Figura 7.9). El DNA con un alto porcentaje de pares GC funde a temperatura más alta que una molécula de tamaño similar con más pares AT. Si el DNA calentado se deja enfriar lentamente, se puede volver a formar el DNA nativo bicatenario. Este proceso puede utilizarse no sólo para formar nuevamente el DNA nativo sino también para formar moléculas híbridas cuyas dos cadenas proceden de fuentes diferentes. La hibridación, es decir, la construcción artificial de un ácido nucleico de doble cadena por apareamiento de dos ácidos nucleicos de cadena sencilla, puede se una herramienta tan poderosa como útil (*véase* Sección 10.12).

✓ 7.2 Revisión de conceptos

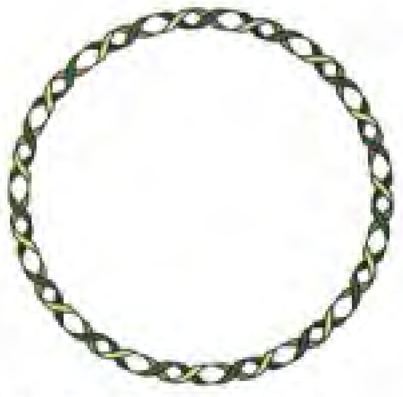
El DNA está generalmente ordenado como una molécula de doble cadena que adopta una conformación helicoidal. Se mide en términos de pares de bases. Las dos cadenas de la doble hélice son antiparalelas. Las dos cadenas de la doble hélice pueden ser separadas experimentalmente por calor en un proceso denominado fusión.

✓ Explique lo que significa antiparalelo en relación con la estructura del DNA de doble cadena.

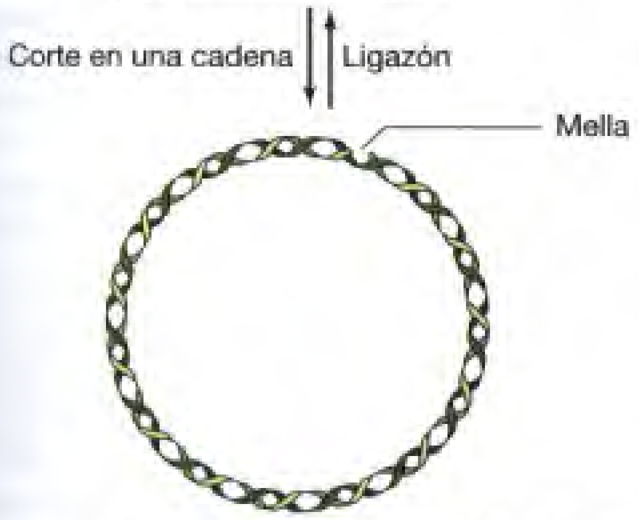
✓ Defina «complementariedad» en referencia a las dos cadenas del DNA

7.3 Estructura del DNA: superenrollamiento

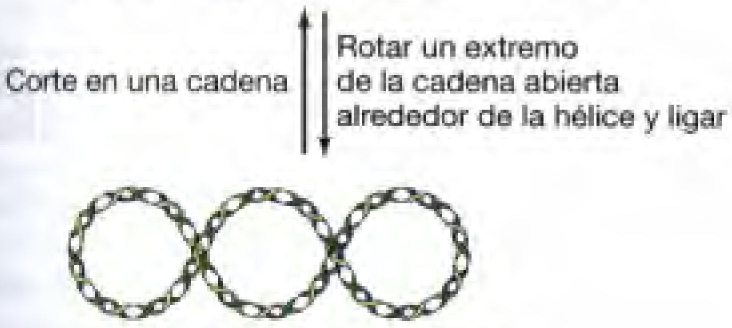
En una molécula de DNA *relajada*, el número de vueltas coincide con exactitud con el que se podría predecir conociendo el número de pares de bases. En la Figura 7.10 se muestra un ejemplo. Si se considera la longitud de una doble hélice relajada y el tamaño de las células microbianas o de los virus, que deben acomodar este DNA en su interior, está claro que debe existir algún tipo de estructura de orden superior ya que tal molécula no podría ser empaquetada en una célula. Por ejemplo, si calculamos la longitud del DNA del cromosoma de *Escherichia coli*, encontraremos que mide más de 1 mm, ¡500 veces más largo que la propia célula de *E. coli*! Tales problemas de empaquetamiento también ocurren en el DNA vírico y en el DNA de las células eucarióticas. ¿Cómo se puede empaquetar tanto DNA en tan poco espacio? La solución: el *superenrollamiento*.



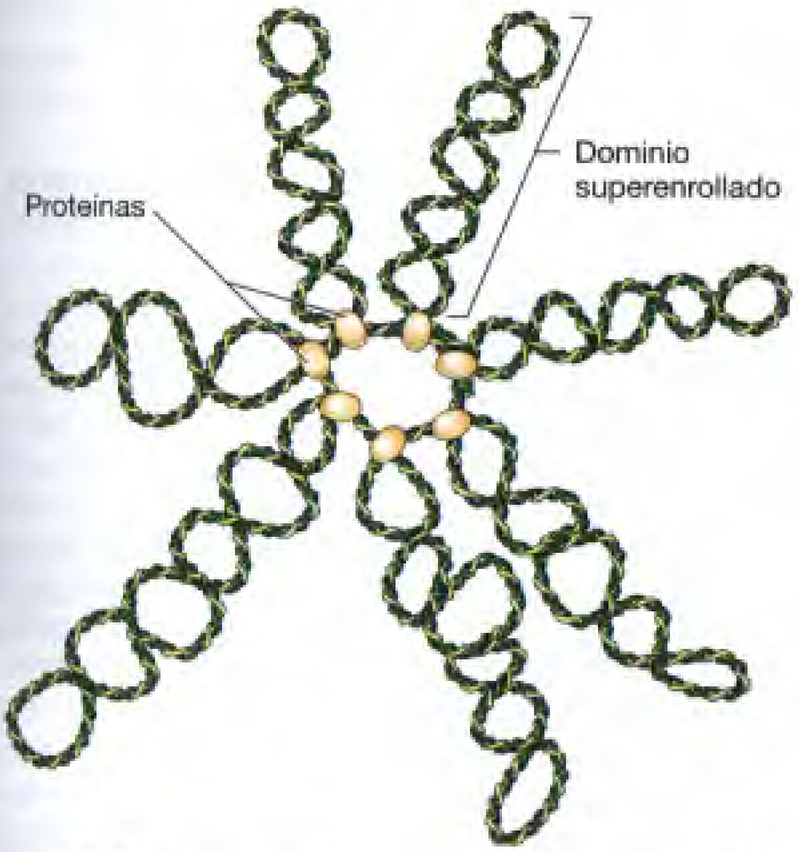
(a) DNA relajado, circular y covalentemente cerrado



(b) DNA relajado, circular, con una mella


Corte en una cadena
Rotar un extremo de la cadena abierta alrededor de la hélice y ligar

(c) DNA circular superenrollado



(d) DNA cromosómico con dominios superenrollados

Figura 7.10 DNA superenrollado. Las partes a, b y c muestran interconversiones entre DNA circular superenrollado relajado a través de una mella en el DNA circular. Una mella es un corte en un enlace fosfodiéster de una cadena. (d) En realidad, el DNA bicatenario en el cromosoma bacteriano está ordenado no en una superhélice, sino en varios *dominios superenrollados*, como se muestra aquí. En *Escherichia coli* se cree que existen más de 50 dominios superenrollados, cada uno de los cuales se estabiliza por la unión de proteínas específicas.

DNA superenrollado

El superenrollamiento es un estado en el que las moléculas de DNA bicatenarias están a su vez retorcidas. Los diagramas de la Figura 7.11 muestran cómo este fenómeno puede producirse en un duplex de DNA circular. El superenrollamiento introduce torsión en la molécula de DNA. El DNA puede superenrollarse en la dirección *positiva* o *negativa*. **El superenrollamiento negativo** ocurre cuando el DNA se tuerce a lo largo de su eje en la dirección *opuesta* a la de la doble hélice (que es hacia la derecha). Ésta es la forma de superenrollamiento en la que el DNA se encuentra en la naturaleza.

Aunque existen proteínas asociadas con el DNA de los procariotas, los cromosomas procarióticos pueden considerarse como DNA «desnudo». No es éste el caso de los cromosomas de eucariotas, que contienen grandes cantidades de proteínas unidas al DNA de manera regular. Como se ha mencionado (*véase* Sección 7.1) cada cromosoma eucariótico contiene una molécula de DNA lineal de doble cadena. Esta molécula de DNA lineal está enrollada alrededor de proteínas llamadas **histonas** de una manera regular formando unas estructuras denominadas **nucleosomas** (Figura 7.11). En los cromosomas de los eucariotas, la formación de los nucleosomas introduce un superenrollamiento negativo. Las histonas son proteínas cargadas positivamente que pueden neutralizar la carga negativa del DNA (debida a los grupos fosfato). Los nucleosomas están espaciados a lo largo de la doble hélice a intervalos muy regulares, pero se pueden agregar para formar un material fibroso llamado *cromatina*. La propia cromatina puede compactarse más aún por plegamiento y formación de bucles formando finalmente una estructura muy densa. Éstas son las estructuras más fácilmente visibles durante la división celular (*véase* Figura 7.23).

Topoisomerasas

En los procariotas, el superenrollamiento del DNA se lleva a cabo de manera muy diferente que en eucariotas. En *Bacteria* y la mayoría de *Archaea*, existe una enzima llamada **DNA girasa** que introduce un superenrollamiento negativo. Primero, la molécula de DNA se retuerce; a continuación, en un punto en que las dos cadenas contactan ocurre un corte en una de ellas y, finalmente, la doble hélice rota se religa en el sitio opuesto de la cadena intacta (Figura 7.12). La DNA girasa es una *topoisomerasa*, específicamente una topoisomerasa II. Observe el origen de la palabra *topoisomerasa*. *Topología* es la rama de las matemáticas que trata de las propiedades de las figuras geométricas que permanecen inalteradas cuando las figuras se retuercen o

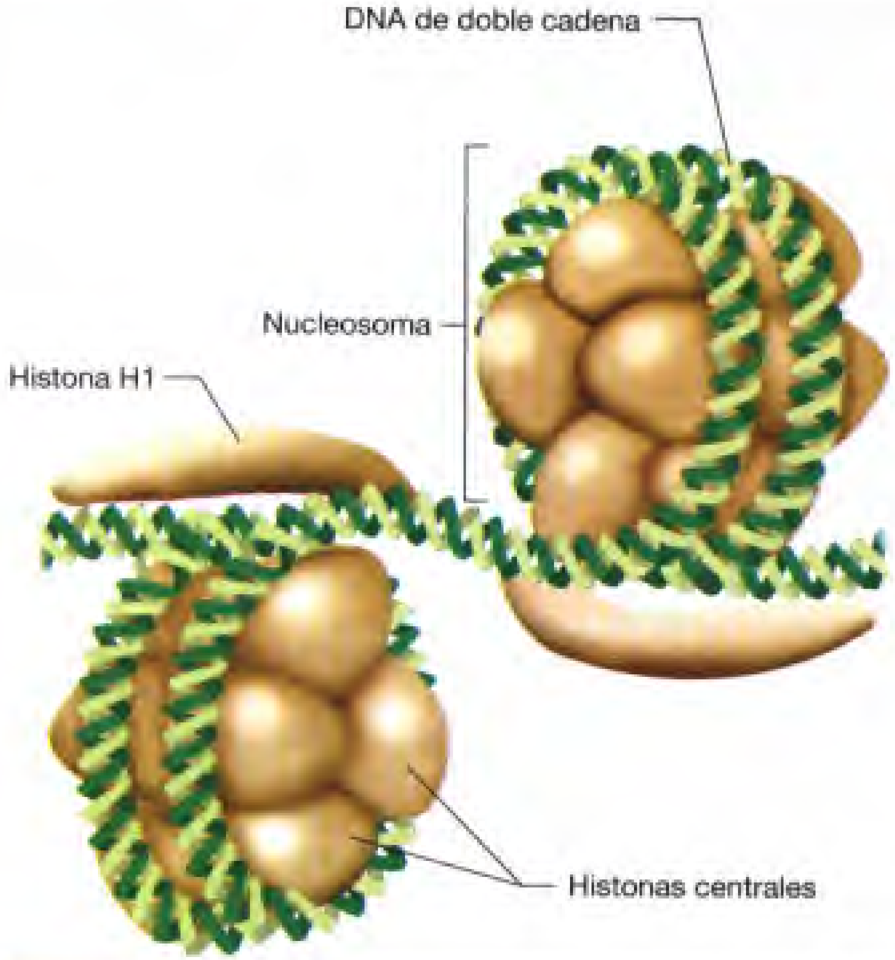


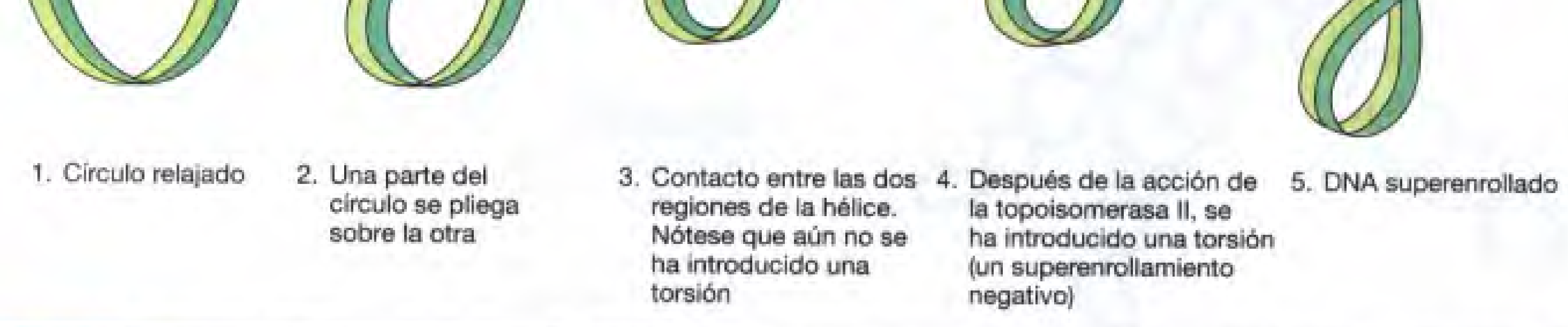
Figura 7.11 Empaquetamiento de DNA alrededor de un núcleo de histonas para formar un nucleosoma. Los nucleosomas se ordenan a lo largo de la cadena del DNA asemejando bolas en una cuerda. Esta conformación es típica del DNA en las células eucarióticas.

contorsionan. Estamos tratando de la topología del DNA y una topoisomerasa es una enzima que afecta a esta topología. Resulta interesante que algunos de los antibióticos que actúan sobre *Bacteria*, tales como las quinolonas (*ácido nalidíxico*), fluoroquinolonas (*ciprofloxacino*) y *novobiocina*, inhiben la acción de la DNA girasa. La novobiocina es también efectiva sobre varias especies de *Archaea*, donde parece inhibir a la DNA girasa.

Otra enzima tiene la capacidad de *eliminar* el superenrollamiento negativo en el DNA. Se denomina *topoisomerasa I*, e introduce un único corte en una de las cadenas del duplex de DNA y produce la rotación de una cadena sencilla alrededor de la otra. Como se muestra en la Figura 7.10, un corte (una **mella**) en el esqueleto de cualquiera de las cadenas permite al DNA regresar al estado relajado, independientemente de que el superenrollamiento sea positivo o negativo. Estas enzimas se encuentran en procariotas y eucariotas. En el DNA lineal, como por ejemplo el de los cromosomas de eucariotas, las proteínas que lleva unidas previenen el regreso al estado relajado. Para prevenir que el cromosoma bacteriano regrese al estado relajado cada vez que se produce una mella, dicho cromosoma contiene *dominios superenrollados*, como se indica en la Figura 7.10. Una mella en el DNA en uno de estos dominios no relaja el DNA de los demás. No está claro cómo se mantiene el DNA en estos dominios, pero posiblemente las proteínas tienen alguna función.

Mediante la acción de estas topoisomerasas, la molécula de DNA puede superenrollarse y relajarse alternativamente. Debido a que el superenrollamiento es necesario para empaquetar el DNA dentro de la célula y la relajación es necesaria para que el DNA pueda replicarse, estos dos procesos complementarios son importantes en la función del DNA en la célula. En la mayoría de los procariotas, el nivel de superenrollamiento negativo es el resultado de un balance entre la actividad de la DNA girasa y la de la topoisomerasa I. Además, se sabe que el superenrollamiento afecta a la expresión génica. Ciertos genes se transcriben más activamente cuando el DNA está superenrollado, mientras que un excesivo superenrollamiento inhibe la transcripción de otros.

Algunos procariotas contienen una enzima llamada *girasa inversa*. Esta topoisomerasa introduce superenrollamiento positivo en el DNA. Los organismos que poseen esta enzima son principalmente especies de *Archaea* que crecen a temperaturas extremadamente altas (hipertermó-


Topoisomerasa II hace cortes en las dos cadenas.
Rotura y unión de la doble cadena

1. Círculo relajado
2. Una parte del círculo se pliega sobre la otra
3. Contacto entre las dos regiones de la hélice. Nótese que aún no se ha introducido una torsión
4. Después de la acción de la topoisomerasa II, se ha introducido una torsión (un superenrollamiento negativo)
5. DNA superenrollado

Figura 7.12 Introducción de superenrollamiento en un DNA circular por acción de la topoisomerasa II, que produce cortes en la doble cadena.

filos, *véanse* Secciones 6.10 y 13.11). Parte del DNA de estos organismos parece estar «relajado», es decir, sin superenrollamiento positivo ni negativo. Esto puede deberse a un balance entre la girasa inversa y la actividad de las proteínas del tipo de las histonas. Un organismo, la *Archaea* hipertermófila *Methanococcus fervidus*, posee estructuras semejantes a nucleosomas donde el DNA está superenrollado positivamente (*véase* Sección 13.11).

El superenrollamiento positivo, originado por la girasa reversa u otros mecanismos, es una especie de «superestructuración» y puede tener una función importante protegiendo al DNA de la desnaturalización. Sin embargo, para que pueda usarse, la información en el DNA debe ser accesible a la maquinaria de la célula. Así, en todas las células la estructura del DNA parece ser bastante dinámica.

✓ 7.3 Revisión de conceptos

La larga molécula de DNA puede empaquetarse en la célula debido a que está superenrollada. En la mayoría de los procariotas este superenrollamiento es causado por enzimas denominadas topoisomerasas. En los cromosomas de eucariotas, el DNA está enrollado alrededor de proteínas llamadas histonas formando una estructura denominada nucleosomas.

- ✓ ¿Por qué es importante el superenrollamiento?
- ✓ ¿Cuál es la función de las topoisomerasas en las células?

7.4 Elementos genéticos

Antes de proceder a describir cómo las células replican su DNA, examinaremos qué tipos de estructura deben ser replicadas. Las estructuras que contienen material genético (DNA en la mayoría de los microorganismos, RNA en algunos virus) se denominan *elementos genéticos*. El **genoma** es el complemento total de genes en una célula o virus. Aunque el principal elemento genético es el *cromosoma*, se conocen otros elementos genéticos que tienen funciones importantes en la función génica en procariotas y eucariotas (Tabla 7.1).

TABLA 7.1 Clases de elementos genéticos

Elemento	Descripción
Procariotas	
Cromosoma	Molécula de DNA bicatenario muy larga, generalmente circular
Plásmido	Molécula de DNA bicatenario extracromosómico, relativamente corto y generalmente circular
Genoma vírico	Molécula de DNA o RNA de cadena doble o sencilla
Elemento transponible	Molécula de DNA bicatenario que se encuentra siempre dentro de otra molécula de DNA
Eucariotas	
Cromosoma	Molécula de DNA bicatenario lineal, extremadamente larga
Plásmido[a]	Molécula de DNA bicatenario extracromosómico, relativamente corto y circular o lineal
Mitocondria o cloroplasto	Moléculas de DNA generalmente circulares de longitud intermedia
Genoma vírico	Moléculas de DNA o RNA de cadena doble o sencilla
Elemento transponible	Molécula de DNA bicatenario que se encuentra siempre dentro de otra molécula de DNA

[a] Los plásmidos son raros en eucariotas.

El cromosoma

En la Sección 2.2, se introdujo el hecho de que un procariota típico tiene un único cromosoma que contiene todos (o la mayoría) los genes de la célula. Los eucariotas tienen múltiples cromosomas formando su genoma. Además, el cromosoma procariótico típico es una molécula de DNA circular, mientras el DNA de todos los cromosomas eucarióticos es lineal. En la Tabla 7.2 se relacionan el número, tamaño y configuración de los cromosomas de algunos microorganismos bien conocidos, procarióticos y eucarióticos. Nótese que el cromosoma de la bacteria *Borrelia burgdorferi*, el agente etiológico de la enfermedad de Lyme (*véase* Sección 27.4) es lineal. Los extremos de este cromosoma tienen repeticiones en horquillas como las mostradas en la Figura 7.8. Aunque no son muy comunes, existen cromosomas lineales en otras *Bacteria*. Miembros del género *Streptomyces* tienen también cromosomas lineales, pero éstos llevan proteínas covalentemente unidas a sus extremos. Comentaremos la importancia de estas proteínas en la Sección 7.7.

Los pocos ejemplos de procariotas dados en la Tabla 7.2 no han sido escogidos al azar. Incluyen especies tanto de *Archaea* como de *Bacteria*, y ejemplos de los cromosomas eucarióticos más grandes y más pequeños. Consideraremos más adelante el hecho de que algunos procariotas, como *Rhodobacter sphaeroides*, tengan más de un cromosoma.

De igual manera, en la Tabla 7.2, sólo aparecen unos pocos ejemplos de microorganismos eucarióticos, pero todos tienen DNA lineal y múltiples cromosomas incluso en la fase haploide. Ambas características son típicas de todos los organismos eucarióticos con independencia de su tamaño. En levaduras (y probablemente en muchos otros microorganismos eucarióticos), la longitud del DNA de un único cromosoma es en realidad más corta que la de un cromosoma procariótico linearizado. Por ejemplo, la cantidad total de DNA por célula de levadura es solamente tres veces mayor que en *Escherichia coli*, pero la levadura tiene 16 cromosomas. En organismos superiores, sin embargo, la longitud del DNA de un solo cromosoma es mayor que el de un cromosoma procariótico abierto y linearizado. El genoma humano haploide sólo tiene algunos cromosomas más que el de la levadura, pero tiene 200 veces más DNA.

La molécula de DNA lineal de un cromosoma eucariótico tiene una secuencia especial de DNA denominada *telómero* en cada extremo y un *centrómero* en algún lugar entre los telómeros. Los centrómeros son importantes para el reparto de los cromosomas durante la división celular. Como veremos, los telómeros juegan un papel importante en la

TABLA 7.2 Tamaños, formas y número de cromosomas en microorganismos representativos de cada dominio

			Cromosoma	
Organismo	**Comentario**	**Tamaño (Mb)**[a]	**Número**	**Geometría**
Bacteria				
Mycoplasma genitalium	Genoma celular más pequeño	0,58	1	○
Borrelia burgdorferi	Agente de la enfermedad de Lyme (*véase* Capítulo 27)	0,91[b]	1	〰
Haemophilus influenzae	Gram negativo, puede causar enfermedad (*véase* Capítulo 26)	1,83[c]	1	○
Rhodobacter sphaeroides	Gram negativo, fototrófico	4,00[d]	2	○
Bacillus subtilis	Gram positivo, modelo genético	4,21	1	○
Escherichia coli K-12	Gram negativo, modelo genético	4,64[e]	1	○
Streptomyces coelicolor	Actinomiceto, produce antibióticos (*véase* Capítulo 12)	8,66	1	〰
Archaea				
Methanococcus jannaschii	Metanógeno, crece a alta temperatura (*véanse* Capítulos 6 y 13)	1,66	1	○
Pyrococcus abyssi	Crece a alta temperatura (*véanse* Capítulos 6 y 13)	1,77	1	○
Halobacterium sp. NRC1	Crece a alta concentración salina (*véanse* Capítulos 6 y 13)	2,57[f]	3	○
Sulfolobus solfatarius	Crece a alta temperatura y alta acidez (*véanse* Capítulos 6 y 13)	2,99	1	○
Eukarya[g]				
Giardia lamblia	Protozoo flagelado, causa gastroenteritis aguda (*véase* Capítulo 14)	12,00	4	〰
Saccharomyces cerevisiae	Levadura, muy usada en ciencia e industria (*véanse* Capítulos 14 y 30)	12,06[h]	16	〰
Dictyostelium discoideum	Hongo mucoso utilizado como modelo de desarrollo (*véase* Capítulo 14)	34,0	6	〰
Tetrahymena thermophila	Protozoo ciliado (*véase* Capítulo 14)	210,0	5	〰

[a] Mb corresponde a megapares de bases. En el caso de *Eukarya*, los tamaños de los genomas y el número de cromosomas corresponde a la fase haploide. (Todos los genomas procarióticos indicados han sido completamente secuenciados.)

[b] Se refiere al cromosoma lineal. El genoma de este organismo contiene al menos 17 plásmidos lineales y circulares, que en conjunto tienen un tamaño de 0,5 Mb.

[c] *Haemophilus influenzae* Rd fue el primer organismo celular cuyo genoma se secuenció completamente.

[d] El cromosoma I tiene 3,1 Mb y el cromosoma II 0,90 Mb. La cepa secuenciada también contiene cinco plásmidos.

[e] La secuencia publicada no incluye la del plásmido F (*véase* Sección 10.8) ni la del babcteriófago lambda (*véase* Sección 9.10). que estarían presentes en una cepa K-12 típica.

[f] Hay un gran cromosoma de 2,01 Mb y dos minicromosomas de 0,19 Mb y 0,37 Mb.

[g] Todos los microorganismos del listado son unicelulares.

[h] *Saccharomyces cerevisiae* fue el primer eucariota en tener su genoma completamente secuenciado. El valor indicado no incluye el genoma mitocondrial ni todas las copias de algunas secuencias repetidas.

replicación de estas moléculas (*véase* Sección 7.7). El número de cromosomas de una especie es constante pero varía ampliamente entre las especies.

En la Sección 7.3, mencionamos una diferencia estructural importante entre los cromosomas procariótico y eucariótico: el DNA de eucariotas está empaquetado en nucleosomas. Existen también interesantes diferencias entre procariotas y eucariotas en cuanto a la organización de la secuencia del DNA.

Una de ellas es que muchos genes de eucariotas que codifican proteínas están interrumpidos por secuencias de DNA no codificadoras, las cuales se encuentran entre las secuencias que en realidad codifican un único polipéptido (*véase* Figura 7.2). Estas secuencias no codificadoras se denominan **intrones**, mientras que las secuencias codificadoras se denominan **exones**. El número de intrones por gen es variable y fluctúa entre ninguno y más de 50. Durante la transcripción, tanto los intrones como los exones se copian, y las secuencias del intrón son posteriormente cortadas y eliminadas cuando el RNA mensajero es procesado a su forma final.

Esencialmente, todos los genes que codifican proteínas en los eucariotas superiores, tales como mamíferos, tienen intrones y algunos de ellos son a menudo más largos que los exones. Los eucariotas inferiores tienen menos intrones y son más cortos. Aproximadamente el 40% de los genes que codifican proteínas en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* posee intrones, mientras sólo el 4% de los de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* los lleva. Se conocen también intrones en los genes de procariotas que codifican proteínas pero son bastante raros y son eliminados del transcrito por mecanismos diferentes.

La otra diferencia importante relativa a la organización de la secuencia es que los eucariotas contienen generalmente mucho más DNA por genoma de lo que se necesita para codificar todas las proteínas requeridas para las funciones celulares. Por ejemplo, en el genoma humano sólo un 3% del total de la secuencia de DNA se encuentra en genes reconocibles, mientras que en *Bacteria* esta fracción excede del 90%. El DNA «extra» en eucariotas se encuentra frecuentemente en secuencias repetidas, algunas cientos de miles de veces. La función de estas secuencias no está clara. Los eucariotas inferiores parecen tener una mayor densidad codificadora que los eucariotas superiores. Un ejemplo extremo parece ser la levadura *Saccharomyces cerevisiae*; aproximadamente el 70% de su DNA codifica proteínas. Aunque esta densidad génica parece bastante alta, es más baja que la de cualquier procariota conocido.

Con frecuencia, los eucariotas tienen muchas copias de ciertos genes, como los que codifican RNA de transferencia y RNA ribosómico. Estos últimos también pueden encontrarse repetidos en procariotas, pero generalmente sólo están presentes, a lo sumo, en unas cuantas copias. Sin embargo, en procariotas existen unas pocas secuencias cortas pero altamente repetidas. Por ejemplo, en *Escherichia coli* K-12 existe una secuencia de 38 pares de bases que está repetida 581 veces y que representa el 0,5% del genoma. Aún así, ambas generalizaciones son correctas: los genomas de eucariotas se caracterizan por tener genes interrumpidos y secuencias repetitivas.

Elementos genéticos no cromosómicos

Se conocen otros elementos genéticos. Aunque algunos de ellos han sido llamados «cromosomas», son bastante diferentes del cromosoma verdadero. Por tanto, nos referiremos colectivamente a ellos como elementos genéticos *no cromosómicos*. Muchos de estos elementos se encuentran exclusivamente en las células, pero éste no es el caso de genomas víricos.

Los **virus** contienen genomas, ya sea de DNA o RNA, que controlan su propia replicación y transferencia de célula a célula. El genoma vírico se denomina también cromosoma. Sin embargo, contiene genes esenciales para el virus, no para la célula hospedadora y, por tanto, es claramente distinto funcionalmente de los cromosomas celulares. (Curiosamente algunos genomas víricos se integran en el cromosoma celular, *véanse* Secciones 9.10, 9.12 y 16.10.) Se conocen cromosomas lineales y circulares. Los virus son especialmente interesantes porque a menudo (aunque no siempre) son causantes de enfermedades. Estudiaremos los virus en los Capítulos 9 y 16, y las enfermedades víricas en los Capítulos 26 y 27.

Los **plásmidos** son elementos genéticos que existen y se replican independientemente del cromosoma. La gran mayoría de los plásmidos son DNA de doble cadena, y aunque la mayoría de los plásmidos son circulares, algunos son lineales. Los plásmidos difieren de los virus en dos aspectos: (1) no causan daño a la célula (generalmente son beneficiosos), y (2) no tienen formas extracelulares como los virus. Aunque los plásmidos se han reconocido en tan sólo unos pocos eucariotas, se han encontrado en la mayoría de las especies procarióticas. Comentaremos los plásmidos en el Capítulo 10.

Además del cromosoma, muchos procariotas parecen contener uno o más plásmidos. Algunos plásmidos contienen genes cuyos productos proteicos pueden conferir propiedades importantes a la célula hospedadora, tales como resistencia a antibióticos. En *Bacteria*, un cromosoma se define como un elemento genético cuyos productos están implicados en etapas metabólicas esenciales *bajo todas las condiciones de crecimiento*. Tales genes se denominan algunas veces como genes de *mantenimiento de la célula* (*house-keeping genes*). Por ejemplo, un gen que codifica una DNA girasa es requerido siempre por la célula, mientras que un gen que confiere resistencia a un antibiótico sólo se requiere bajo ciertas condiciones (la presencia del antibiótico). Por tanto, la prueba de que un procariota tiene más de un cromosoma requiere la demostración de que cada cromosoma contiene genes que, en una sola copia, son esenciales. Sin embargo, incluso utilizando una condición tan exigente, hay varios procariotas que tienen claramente más de un cromosoma, entre los que se encuentran *Rhodobacter sphaeroides* y *Halobacterium* sp. NRC1 (*véase* Tabla 7.2), así como miembros del género *Brucella*. Algo parecido podría ocurrir en la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* (*véase* Tabla 7.2), que posee un genoma complejo que incluye un gran cromosoma lineal y varios plásmidos lineales y circulares.

Las **mitocondrias** y los **cloroplastos** de los eucariotas contienen elementos genéticos no-cromosómicos. La mitocondria es el sitio de las enzimas respiratorias y tiene una función importante en la generación de energía en la mayoría de eucariotas (*véase* Sección 14.2). El cloroplasto es una estructura verde que contiene clorofila y es el lugar de la síntesis autotrófica de ATP (*véase* Sección 14.3). Desde un punto de vista genético, las mitocondrias y los cloroplastos pueden considerarse elementos genéticos que se replican independientemente. Sin embargo, estos orgánulos son mucho más complejos que los plásmidos y los virus, ya que contienen no sólo DNA sino también una maquinaria completa para sintetizar proteínas tales como ribosomas 70S, RNA de transferencia y el resto de los componentes necesarios para la traducción y la formación de proteínas funcionales. Aunque los genomas encontrados en mitocondrias y cloroplastos pueden contener muchos genes y el sistema completo de traducción, su existencia no es independiente de los cromosomas celulares puesto que la mayoría de sus proteínas no están codificadas por el DNA del orgánulo, sino por el DNA cromosómico de la célula.

Los **elementos transponibles** son piezas de DNA que pueden moverse de un lugar a otro del cromosoma. Los elementos transponibles pueden encontrarse en procariotas y eucariotas y son importantes en la variabilidad genética. En procariotas existen tres tipos de elementos transponibles: las secuencias de inserción, los transposones y algunos virus especiales. Las *secuencias de inserción* son los más simples y no llevan otra información genética que la requerida para moverse a lugares nuevos . Los *transposones* son más grandes y contienen genes adicionales. Veremos ambos tipos en detalle en el Capítulo 10. En el Capítulo 16 estudiaremos un virus bacteriano, Mu, que es también un elemento transponible. Una característica única de los elementos transponibles es que *se replican como parte de alguna otra molécula de DNA*.

Replicación del DNA
TUTORÍA

✓ 7.4 Revisión de conceptos

Además del cromosoma, en la célula existen otros elementos genéticos. Los plásmidos son moléculas de DNA independientes del cromosoma de la célula. Las mitocondrias y los cloroplastos contienen sus propios genomas con DNA. Los virus contienen un genoma, DNA o RNA, que controla su propia replicación. Los elementos transponibles existen como parte de otros elementos genéticos.

- ✓ ¿Qué es un genoma?
- ✓ ¿Qué material genético se encuentra en todos los cromosomas celulares?
- ✓ ¿Qué define un cromosoma en procariotas?

III REPLICACIÓN DEL DNA

En el resto de este capítulo examinaremos en más detalle las tres etapas de la transmisión de la información biológica. La primera es la replicación del DNA. En todos los organismos la replicación del DNA es necesaria para la división celular, ya sea para generar nuevos organismos, como ocurre en organismos unicelulares, o para producir nuevas células en un organismo pluricelular. El proceso debe ser preciso, de manera que las nuevas células u organismos posean esencialmente la misma información genética que la célula progenitora. Así, la secuencia de bases nucleotídicas existente en cada molécula larga de la doble hélice de DNA deber duplicarse con precisión para generar una copia de la molécula original.

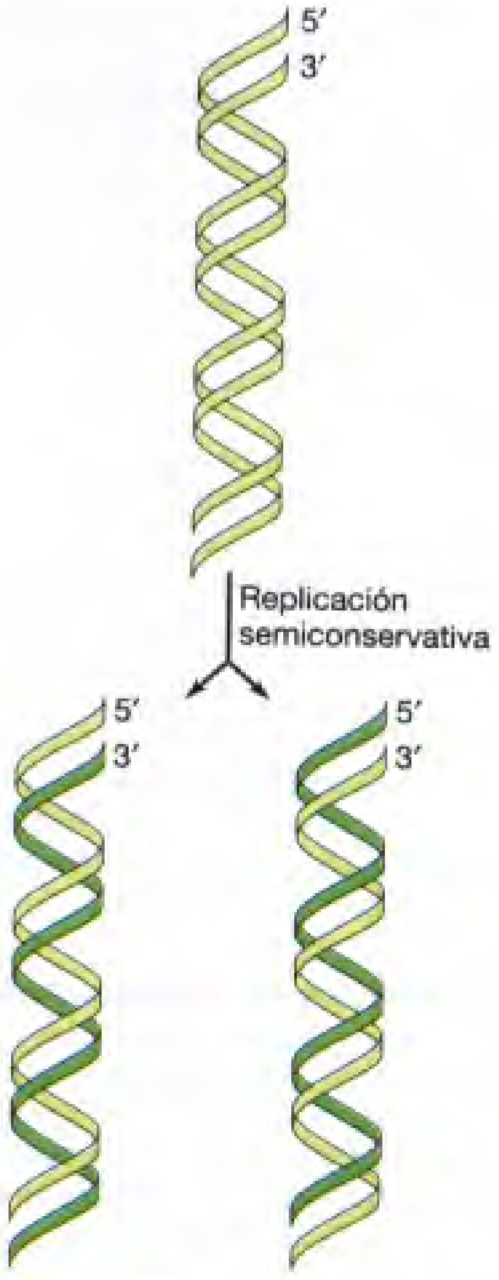


Figura 7.13 La replicación del DNA es un proceso semiconservativo tanto en procariotas como en eucariotas. Nótese que cada una de las dobles hélices nuevas contiene una cadena nueva y otra vieja.

7.5 Replicación del DNA: moldes e iniciadores

La demostración de que el DNA es una doble hélice con *bases complementarias apareadas* fue clave para entender su replicación. Como hemos mencionado (*véase* Figura 7.3), la adenina se aparea específicamente con la timina y la guanina se aparea específicamente con la citosina. Si la doble hélice de DNA se abre, puede sintetizarse nueva cadena complementaria de cada una de las cadenas parentales. Como se muestra en la Figura 7.13, la replicación es **semiconservativa**, es decir, cada una de las dos dobles hélices resultantes contiene una cadena parental y otra de nueva síntesis.

La molécula de DNA que es copiada para formar una complementaria se denomina *molde*. Un molde es un modelo preformado que puede copiarse. La *nueva* molécula de DNA no está covalentemente conectada con la *vieja* molécula de DNA.

La química del DNA, la naturaleza de sus precursores y las actividades de las enzimas involucradas en la replicación imponen algunas restricciones importantes al modo en que se sintetiza la nueva cadena. El precursor de cada nucleótido en la cadena es un nucleótido 5′-*trifosfato*, del cual se eliminan los dos fosfatos terminales y el fosfato interno se une covalentemente a la ribosa de la cadena naciente (Figura 7.14). La adición del nucleótido a la cadena naciente requiere la presencia de un grupo hidroxilo libre, y tal grupo hidroxilo libre se encuentra exclusivamente en el extremo 3′de la molécula. Esta restricción química conduce a una importante ley que es la base de muchos aspectos de la replicación del DNA: *la replicación del DNA siempre ocurre desde el extremo 5′ al hidroxilo del extremo 3′, uniéndose el fosfato 5′ de cada nucleótido nuevo que se incorpora al hidroxilo 3′ del nucleótido añadido previamente.*

Las enzimas que catalizan la adición de los nucleótidos se **denominan DNA polimerasas**. Todas las DNA polimerasas sintetizan el nuevo DNA en la dirección 5′→ 3′. *Sin embargo, no se conoce polimerasa alguna que pueda iniciar una nueva cadena. Todas estas enzimas únicamente pueden añadir un nucleótido a un 3′-OH preexistente.* Así, para que pueda comenzarse una nueva cadena, debe existir un **iniciador** («primer»), un lugar al que la DNA polimerasa pueda añadir el primer nucleótido. En la mayoría de los casos, el iniciador es un fragmento corto de *RNA*.

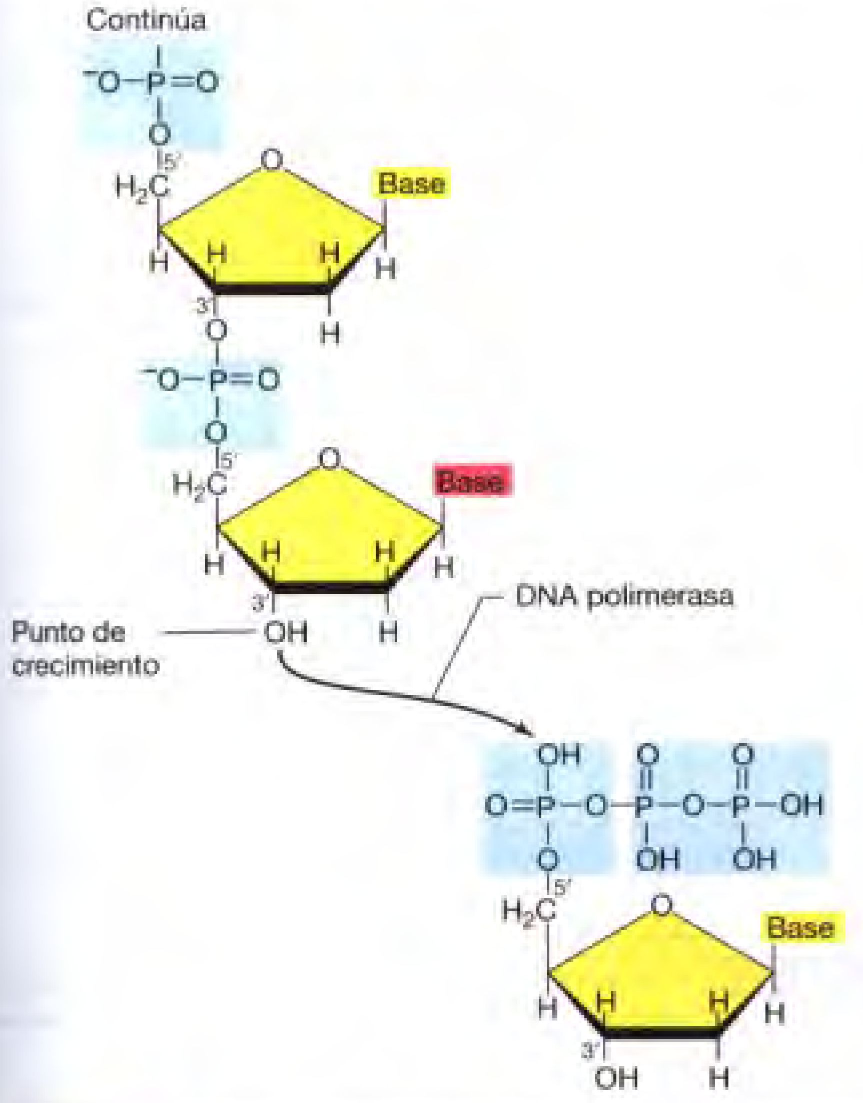


Figura 7.14 Estructura de la cadena de DNA y mecanismo de crecimiento por adición de un desoxirribonucleósido trifosfato al extremo 3′de la cadena. El crecimiento siempre se produce desde el extremo 5′ al extremo hidroxilo 3′. La enzima DNA polimerasa cataliza la reacción de adición. Los cuatro desoxirribonucleótidos que sirven como precursores son la deoxitimidimina trifosfato (dTTP), deoxiadenosina trifosfato (dATP), deoxiguanosina trifosfato (dGTP) y deoxicitidina trifosfato (dCTP). Los dos fosfatos terminales del trifosfato son escindidos como pirofosfato (PP_i). Por tanto, se consumen dos enlaces ricos en energía por cada nucleótido añadido.

Cuando la doble hélice se abre al comienzo de la replicación, primero actúa una enzima que polimeriza RNA, lo que da como resultado la síntesis de este RNA iniciador. Una enzima específica que polimeriza RNA, llamada *primasa*, participa en la síntesis del iniciador, sintetizando un corto fragmento de RNA. En el extremo creciente de este RNA iniciador, existe un grupo 3′-OH al cual la DNA polimerasa añade el primer desoxirribonucleótido. Por tanto, la subsecuente elongación de la molécula se produce como DNA y no como RNA. De esta manera, la nueva molécula sintetizada tiene una estructura como la representada en la Figura 7.15. El iniciador puede ser eventualmente eliminado, como veremos más adelante.

✓ 7.5 Revisión de conceptos

Ambas cadenas de la hélice de DNA sirven como moldes para la síntesis de dos nuevas cadenas. Cada una de las dos hélices dobles de la progenie contiene una cadena parental y una cadena nueva. Las nuevas cadenas son siempre elongadas mediante la adición de monómeros al extremo 3′. Las DNA polimerasas no pueden comenzar nuevas cadenas. Por tanto, las cadenas nuevas deben empezar con un iniciador, usualmente RNA.

- ✓ ¿A qué extremo de la cadena de DNA de nueva síntesis añade la polimerasa una base?
- ✓ ¿Por qué se requiere un iniciador para la replicación del DNA?

7.6 Replicación del DNA: la horquilla de replicación

Para entender la replicación completa de un DNA de doble cadena, lo más fácil es escoger un ejemplo real y ver cómo se replica. Gran parte de la información sobre los mecanismos de replicación se obtuvieron de la bacteria *Escherichia coli*, y la explicación que sigue se circunscribe primariamente es este organismo.

Iniciación de la síntesis de DNA

Como ocurre con la mayoría de los procariotas, el cromosoma de *Escherichia coli* es una molécula de DNA circular. Además, como en otras bacterias, existe un único sitio en el cromosoma en el que se inicia la síntesis de DNA, el denominado **origen de replicación**. El origen de replicación consiste en una secuencia específica de 300 pares de bases que es reconocida por proteínas específicas de la iniciación. En el origen de replicación, la doble hélice de DNA se abre y la iniciación de la replicación del DNA se produce en las dos cadenas. A medida que la replicación procede, el sitio de replicación, denominado **horquilla de replicación**, parece moverse a lo largo del DNA.

La replicación es frecuentemente bidireccional desde el origen de replicación como se indica en la Figura 7.16 y, por tanto, existen dos horquillas de replicación replicando en direcciones opuestas. En el DNA circular, la replicación bidireccional conduce a la formación de estructuras características denominadas **estructuras theta**. La mayoría de las grandes moléculas de DNA, procarióticas o eucarióticas, tiene replicación bidireccional desde un origen fijo. Cada cromosoma eucariótico tiene muchos orígenes. Esto no es simplemente porque el DNA es más largo ya que, como hemos visto, no siempre éste es el caso (*véase* Sección 7.4). Puede reflejar el hecho de que las DNA polimerasas de eucariotas no replican tan rápidamente como las enzimas de procariotas. La replicación del DNA está cuidadosamente regulada, y esta regulación tiene lugar en el origen.

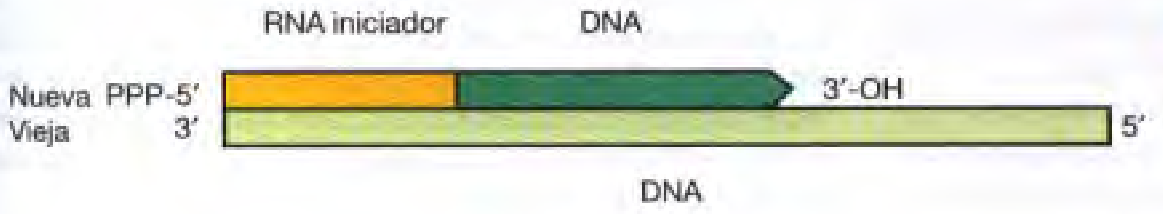


Figura 7.15 Estructura del complejo RNA-DNA que se forma al iniciarse la síntesis de DNA.

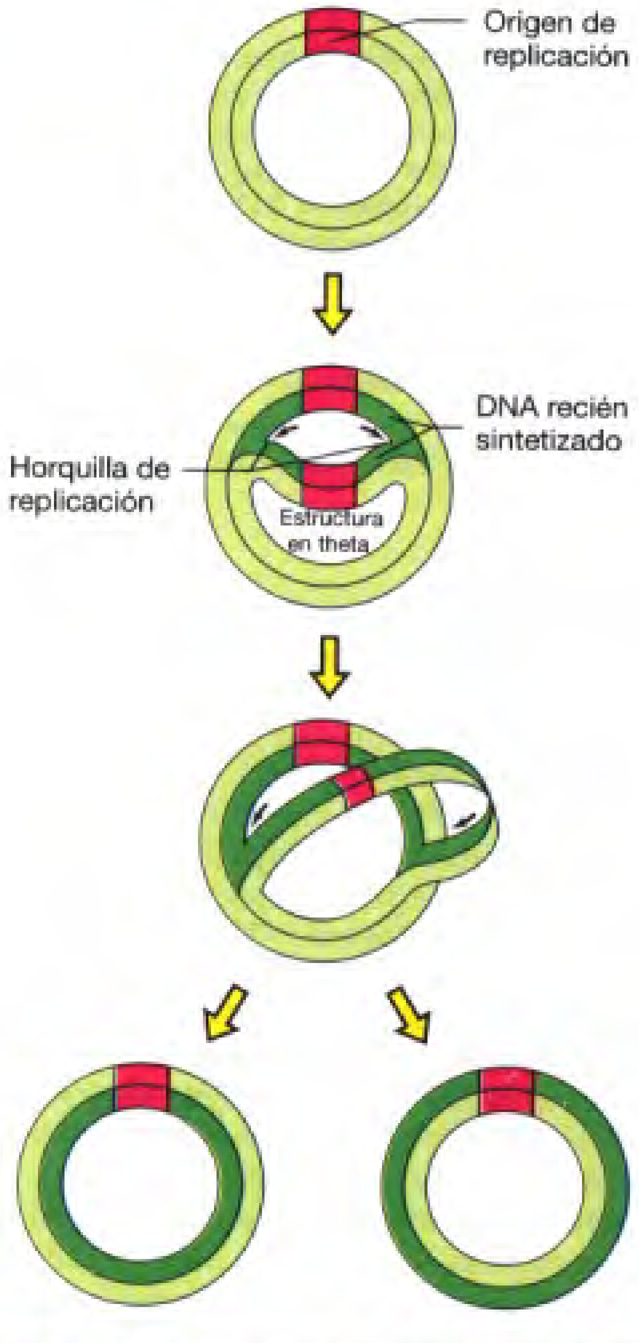


Figura 7.16 En el DNA circular, la replicación bidireccional desde un origen conduce a la formación de intermediarios replicativos que recuerdan a la letra griega theta (Θ).

Cadena líder y cadena retardada

Existen cinco DNA polimerasas diferentes en *Escherichia coli*, denominadas DNA polimerasas I a V. La DNA polimerasa III es la enzima principal de la replicación en la horquilla de replicación. Sin embargo, otras enzimas también se encuentran implicadas. Los detalles de lo que acontece en la horquilla de replicación se ilustran en la Figura 7.17. En la horquilla de replicación, la doble hélice de DNA de desenrolla formándose una pequeña región de cadena sencilla, por la acción de proteínas específicas llamadas *helicasas*. Las helicasas son enzimas dependientes de ATP que hidrolizan ATP cuando se mueven a lo largo de la hélice delante de la horquilla de replicación (Figura 7.18). La región de cadena sencilla generada está asociada a una proteína especial, *la proteína que se une a cadena sencilla*, que estabiliza el DNA de cadena sencilla, impidiendo la formación de puentes de hidrógeno intracatenarios.

En la Figura 7.17 se advierte una importante diferencia entre la replicación de las dos cadenas, la cual surge del hecho de que la replicación del DNA procede siempre en

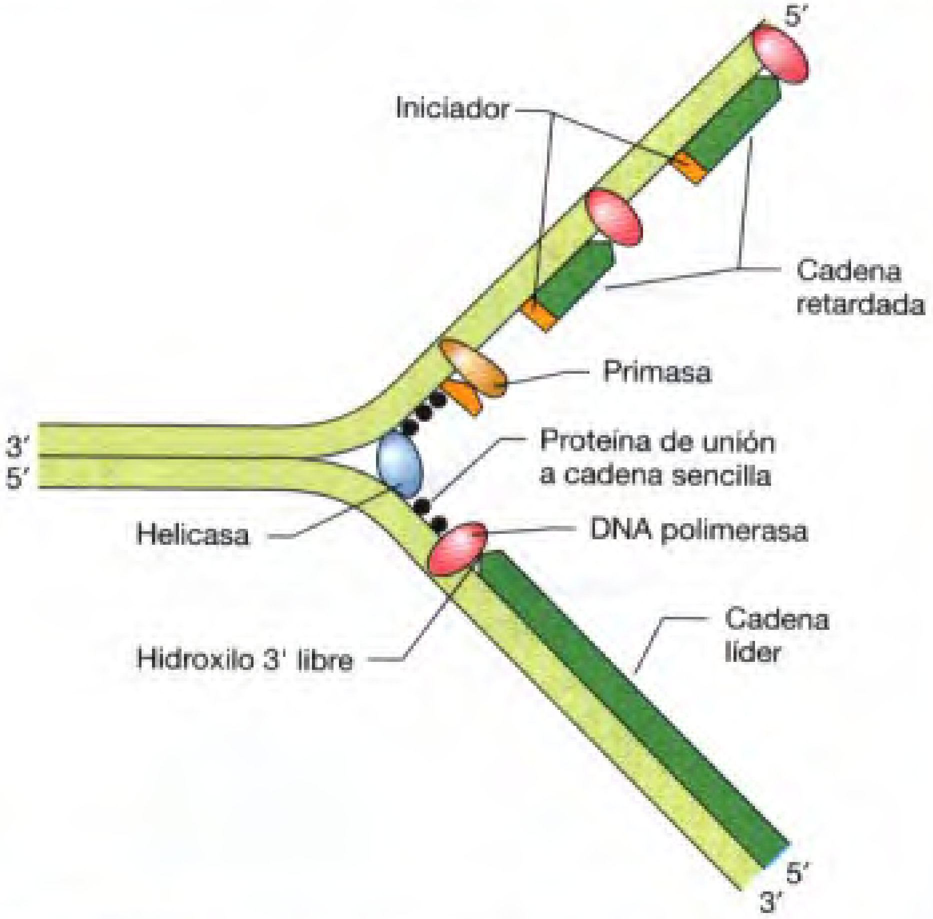


Figura 7.17 Acontecimientos que ocurren en la horquilla de replicación del DNA. Nótese la polaridad y la naturaleza antiparalela de las cadenas del DNA.

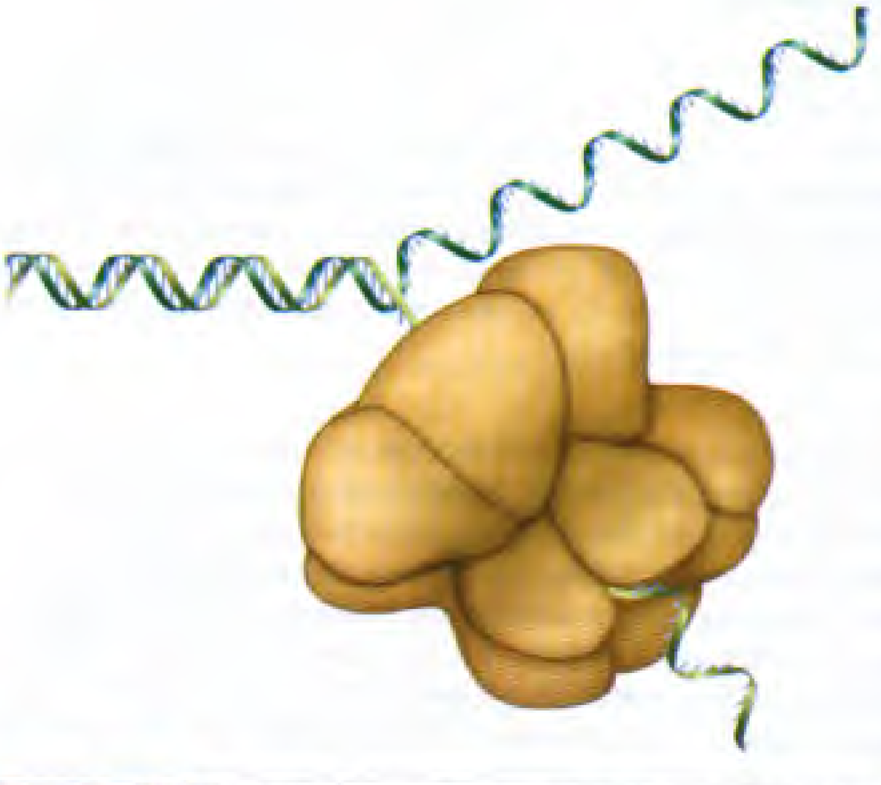


Figura 7.18 Una DNA helicasa desenrollando la doble hélice. Esta figura es una adaptación del trabajo de Smita S. Patel y muestra un modelo de un conjunto de subunidades de DNA helicasa moviéndose a lo largo del DNA. Lo que hace esta figura tan radicalmente diferente de los diagramas mostrados en las Figuras 7.17, 7.19, 7.20 y 7.21 es que la posición de la proteína y las moléculas de DNA están aquí dibujadas a escala. Los diagramas simples se utilizan a menudo para dar una idea de los procesos moleculares que se producen en la célula pero pueden dar la impresión de que la mayoría de las proteínas son relativamente pequeñas comparadas con el DNA. Este modelo a escala muestra otra cosa diferente.

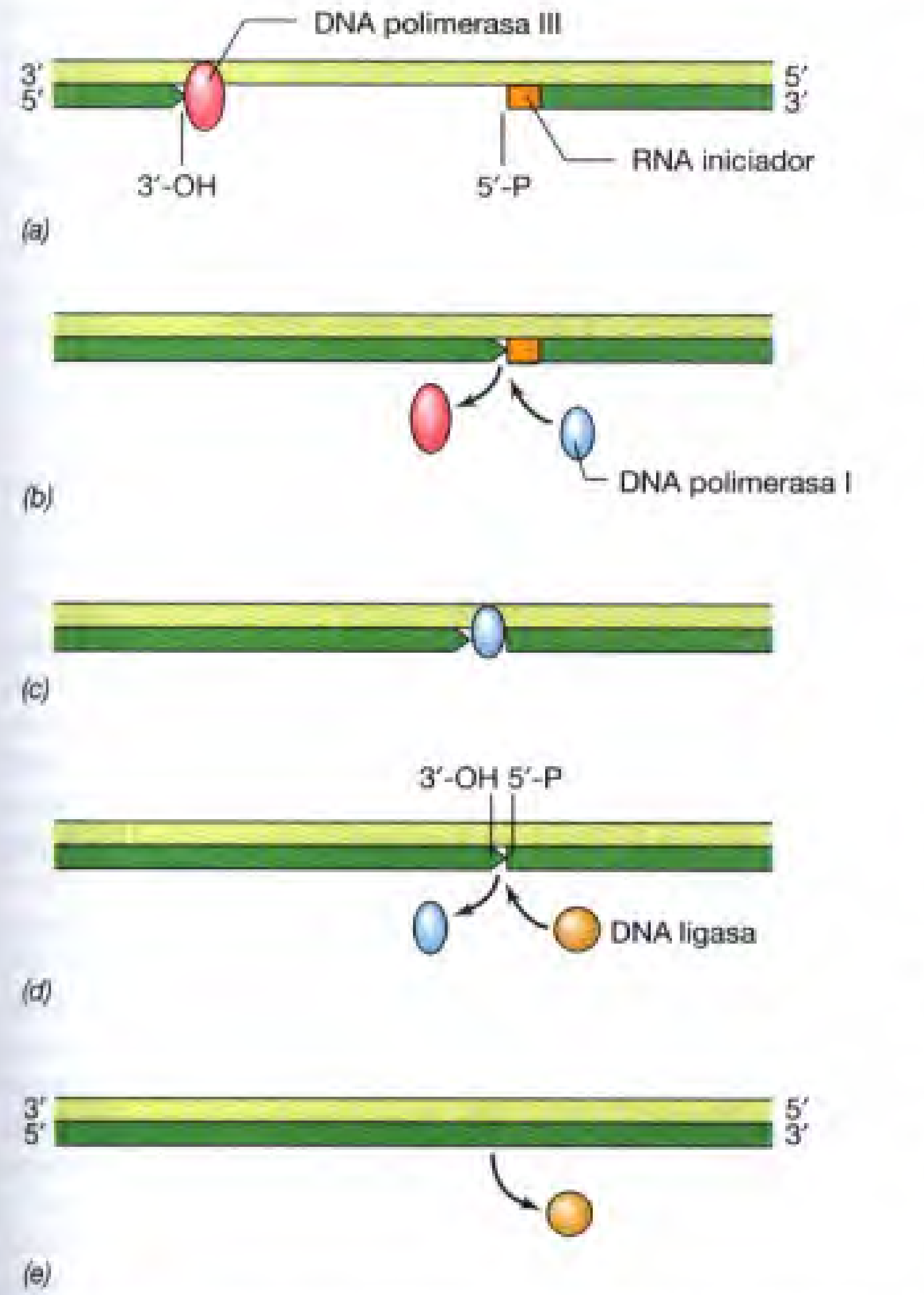


Figura 7.19 Ligazón de dos fragmentos en la cadena retardada. (a) La DNA polimerasa III está sintetizando DNA en la dirección 5' → 3' hacia el iniciador de RNA de un fragmento sintetizado previamente en la cadena retardada. (b) Al llegar a este fragmento, la DNA polimerasa I reemplaza a la III. (c) La DNA polimerasa continúa sintetizando DNA a la vez que elimina el iniciador de RNA del fragmento previo. (d) La DNA ligasa reemplaza a la DNA polimerasa I cuando el iniciador ha sido eliminado. (e) La DNA ligasa sella el hueco y liga los dos fragmentos.

la dirección 5'-fosfato a 3'-hidroxilo (añadiendo siempre un *nuevo* nucleótido al extremo 3'-OH de la cadena que crece). En la cadena que crece desde el 5'-fosfato al 3'-hidroxilo, llamada **cadena líder**, la síntesis de DNA se produce *continuamente* porque siempre existe un 3'-OH al que añadir un nuevo nucleótido. Pero en la cadena opuesta, llamada **cadena retardada**, la síntesis de DNA ocurre *discontinuamente* (ya que no existe 3'-OH en la horquilla de replicación al que se pueda unir un nuevo nucleótido). ¿Dónde se encuentra el 3'-OH en esta cadena? En el extremo *opuesto, lejos* de la horquilla de replicación. Por tanto, en la cadena retardada debe sintetizarse primero un pequeño (11 bases) iniciador de RNA para suministrar el extremo 3'-OH libre. Después de sintetizarse el iniciador, la primasa es reemplazada por la enzima DNA polimerasa III. Entonces, se añaden los desoxirribonucleótidos hasta que la DNA polimerasa III se encuentra con el DNA sintetizado previamente.

En este momento, la DNA polimerasa III se detiene. La siguiente enzima involucrada, *DNA polimerasa I*, tiene más de una actividad. Puede sintetizar DNA sin problemas. Sin embargo, a medida que adiciona nucleótidos al extremo 3'-OH, posee una actividad *exonucleasa* 5'→ 3' que elimina el RNA con el que se encuentra (Figura 7.19). Cuando el iniciador se ha eliminado y reemplazado con DNA, la DNA polimerasa I se libera. El último enlace fosfodiéster se forma por una enzima llamada *DNA ligasa*. (Esta enzima sella cualquier corte que tenga un fosfato 5'-P y un 3'-OH, y junto con la DNA polimerasa I está implicada en la reparación del DNA.)

Cada corto fragmento de DNA sintetizado por la DNA polimarasa III en la cadena retardada se denomina *fragmento de Okazaki* y tiene una longitud de unas 1000 bases. Cada uno debe iniciarse individualmente. Por el contrario, la cadena líder se inicia sólo una vez, al comienzo. Debido a la bidireccionalidad, existen dos horquillas de replicación moviéndose en direcciones opuestas (*véase* Figura 7.16), lo que significa que ya en el origen se forman dos cadenas líder y dos cadenas retardadas (Figura 7.20).

Mientras continúa la síntesis de DNA en la horquilla de replicación, se producen cambios en el enrollamiento del DNA, modificados por enzimas desenrollantes y topoisomerasas (*véase* Sección 7.3). Obviamente, el desenrollamiento es una necesidad de la replicación del DNA, y dado que el DNA superenrollado tiene mucha tensión, se desenrolla más fácilmente que si no estuviera superenrollado. Así, regulando el grado de superenrollamiento, las topoisomerasas regulan el proceso de replicación (y también la transcripción, como veremos más adelante).

La Figura 7.17 muestra las diferencias en replicación de las cadenas líder y retardada y las enzimas implicadas. De esta simplificación, parece deducirse que cada horquilla

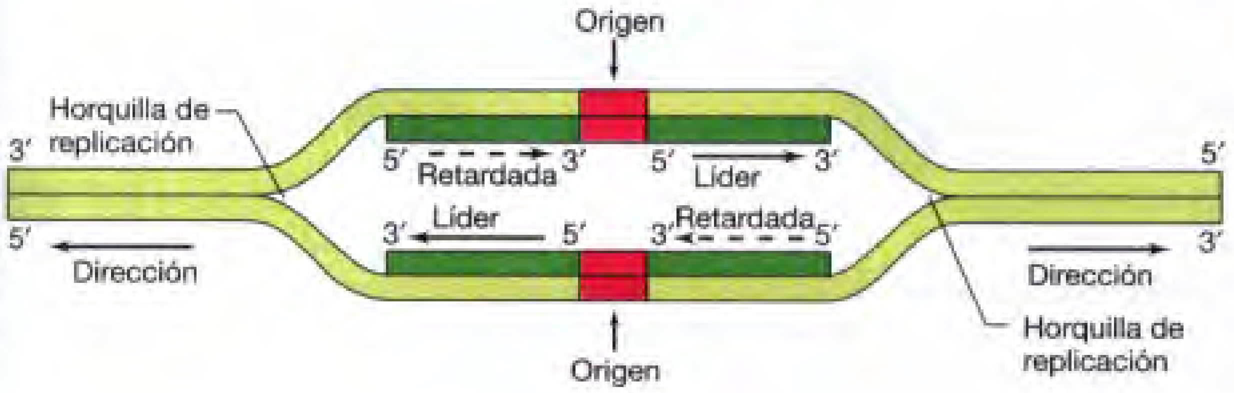


Figura 7.20 Las dos horquillas de replicación deben comenzar en un origen que dirige la replicación bidireccional. Por tanto, deben iniciarse dos cadenas líderes, cada una en una dirección.

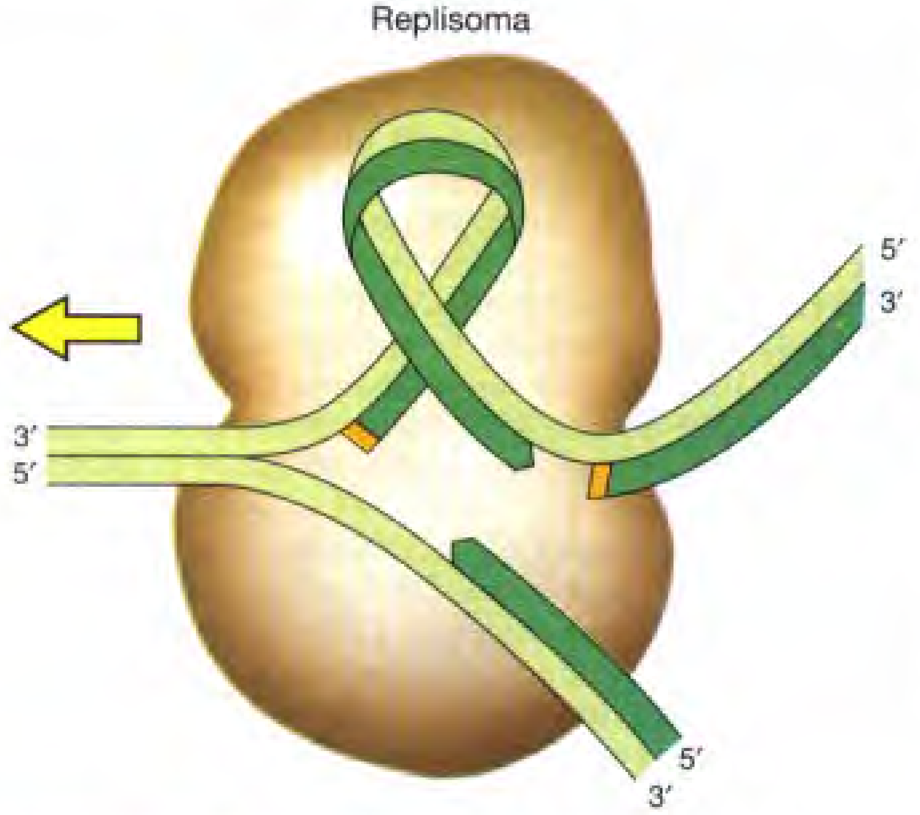


Figura 7.21 Movimiento del replisoma, un complejo de proteínas y enzimas implicadas en la replicación del DNA bicatenario. Todas las reacciones mostradas en la Figura 7.17 están teniendo lugar, pero el bucle en la cadena retardada permite al complejo moverse suavemente hacia delante en la horquilla de replicación.

de replicación debe consistir de DNA polimerasa moviéndose continuamente hacia delante, y una o más polimerasas saltando para polimerizar la cadena retardada. En realidad, las dos cadenas están siendo sintetizadas por un dímero de DNA polimerasas. Esto es posible por la *formación de un bucle* en la cadena retardada como se muesta en la Figura 7.21. El *replisoma* es un complejo que contiene helicasas, primasa, dos moléculas de DNA polimerasa III y otras proteínas asociadas. El complejo DNA polimerasa está fijo hacia la mitad de la célula bacteriana y actúa como una *factoría de replicación*, tirando del DNA molde hacia él a medida que tiene lugar la replicación. Por tanto, es el DNA y no la polimerasa lo que se mueve durante la replicación.

Fidelidad de la replicación del DNA: actividad correctora

Los errores en la replicación del DNA producen mutaciones. Las velocidades de mutación en los organismos vivos son muy bajas, entre 10^{-8} y 10^{-11} por par de bases insertados. Esta precisión es posible en parte porque la DNA polimerasa tiene *dos* posibilidades de incorporar la base correcta en un sitio determinado. La primera posibilidad ocurre cuando se insertan las bases complementarias de acuerdo con la regla de apareamiento de las bases, A con T y G con C, usando la cadena molde como modelo. La segunda posibilidad ocurre a causa de la segunda actividad enzimática, denominada **actividad correctora**, asociada tanto a la DNA polimerasa I como a la DNA polimerasa III (Figura 7.22). Además de insertar nucleótidos en la cadena naciente, estas DNA polimerasas también poseen una actividad exonucleasa 3′ → 5′ que puede eliminar un nucleótido mal insertado y reemplazarlo por el nucleótido correcto. La actividad correctora se activa si se ha insertado una base incorrecta, ya que esto crea un apareamiento de bases inestable. Esta actividad correctora da a la actividad polimerasa una segunda posiblidad para insertar el nucleótido correcto (Figura 7.22). (Nótese que la actividad exonucleasa correctora es la *opuesta* a la actividad nucleasa 5′ → 3′ de la DNA polimerasa I utilizada para eliminar el iniciador con el que se encuentra la polimerasa, una actividad exclusiva de la DNA polimerasa I.)

Las exonucleasas correctoras existen en los sistemas de replicación procarióticos, eucarióticos y víricos. Sin em-

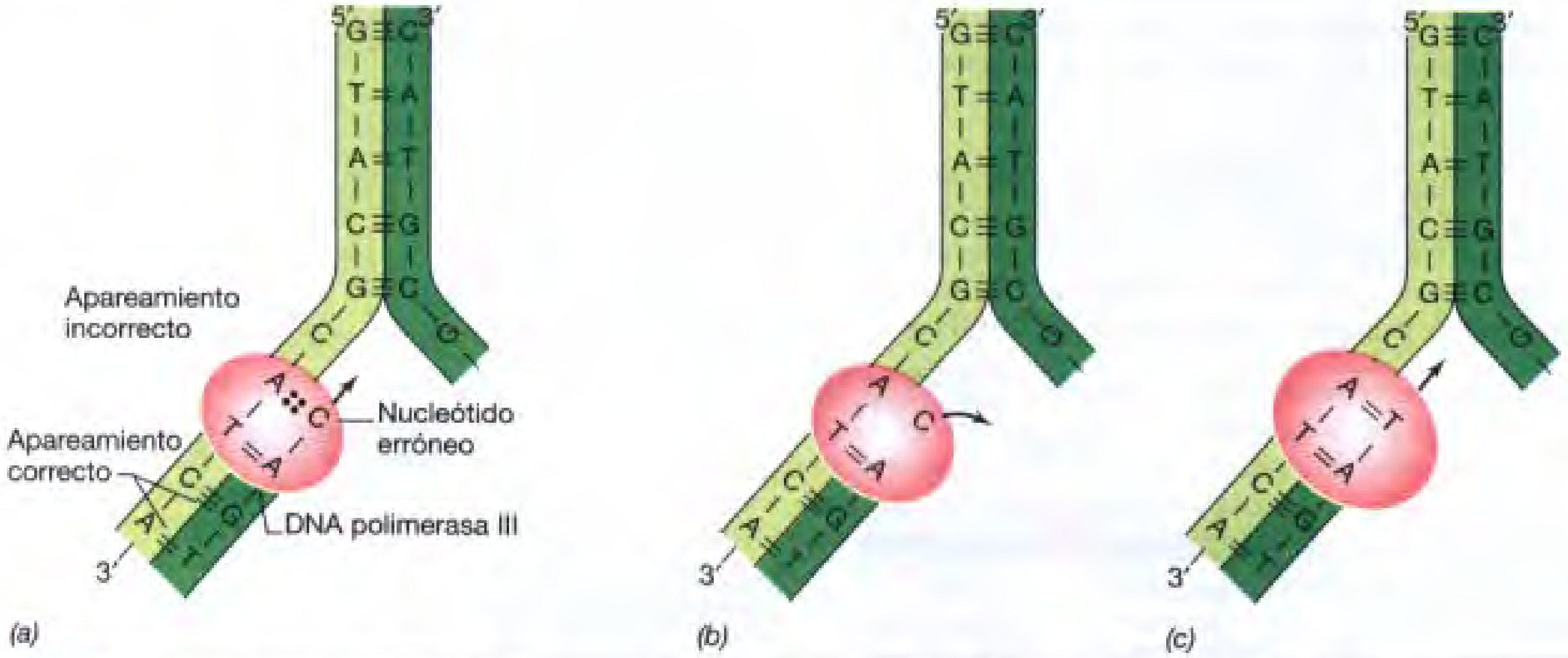


Figura 7.22 Actividad correctora de la DNA polimerasa III por medio de la actividad exonucleasa 3′ → 5′. (a) Una base introducida erróneamente en el extremo causa la parada momentánea de la polimerasa. Ésta es la señal para que la actividad correctora (b) elimine la base incorrecta, después de lo cual se incorpora la base correcta (c) por la actividad polimerasa.

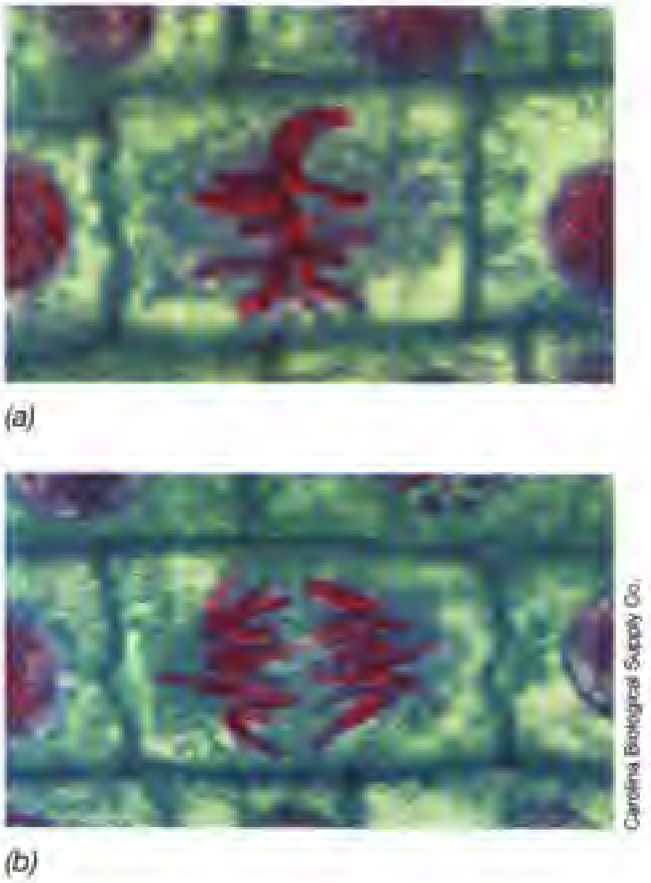
bargo, muchos organismos tienen otros mecanismos para reducir los errores originados durante la replicación del DNA. Discutiremos algunos en el Capítulo 10.

Terminación de la replicación

Los detalles del proceso de terminación de la horquilla de replicación no se conocen totalmente, pero está claro que ambas horquillas de replicación no chocan entre sí como dos trenes. Ciertas secuencias de DNA y proteínas específicas están implicadas en detener las horquillas de replicación y permitir la terminación del proceso. Cuando la replicación de la molécula circular se completa, las dos moléculas circulares quedan enlazadas como los eslabones de una cadena. Éstas pueden ser desenganchadas por una topoisomerasa.

Otro problema en el que no entraremos en detalle es la partición de las dobles hélices replicadas entre las células hijas. En el Capítulo 6, resaltamos que la síntesis de la pared celular está acoplada a la división celular (*véase* Sección 6.2). Obviamente resulta crítico que, tras la replicación, el DNA se reparta de manera que cada célula hija tenga una copia del cromosoma.

El proceso ha sido investigado durante mucho más tiempo en eucariotas superiores dado que el aparato celular implicado es visible al microscopio óptico. En células eucarióticas, el núcleo se divide tras la duplicación del número de cromosomas según un proceso denominado **mitosis**, el cual produce dos células hijas, cada una con un conjunto completo de cromosomas. Durante la mitosis, los cromosomas eucarióticos están más compactados (*véase* Sección 7.3) y se visualizan más fácilmente (Figura 7.23). Pequeñas proteínas denominadas *microtúbulos* son importantes en el proceso mitótico. Los microtúbulos, junto con otras conjuntos de proteínas, se unen a secuencias específicas de los cromosomas y funcionan en la formación del aparato mitótico, que es la estructura real que mueve los cromosomas hacia ambos polos de la célula que se divide (*véase* Figura 7.23). Existe alguna evidencia de que en procariotas pueden existir proteínas que se unan a secuencias específicas de DNA y ayuden a tirar de los cromosomas hacia las células hijas.



Carolina Biological Supply Co.

Figura 7.23 Mitosis vista al microscopio óptico. Éstas son células de la punta de raíz de la cebolla que han sido teñidas para revelar el ácido nucleico y los cromosomas. (a) Metafase. Los cromosomas están apareados en el centro de la célula. (b) Anafase. Los cromosomas se están separando.

✓ 7.6 Revisión de conceptos

La síntesis de DNA comienza en una localización única llamada origen de replicación. La doble hélice es desenrollada por la helicasa y estabilizada por proteínas que se unen a DNA de cadena sencilla. La extensión del DNA se produce continuamente en la cadena líder y discontinuamente en la cadena retardada. La mayoría de los errores en el apareamiento de las bases se subsanan mediante funciones de corrección asociadas a la acción de la DNA polimerasa.

- ✓ ¿Por qué existen cadenas líderes y cadenas retardadas?
- ✓ ¿Por qué la actividad correctora es tan importante para la célula?

7.7 Replicación del DNA: elementos genéticos lineales

Las moléculas de DNA circular son comunes; la mayoría de los cromosomas procarióticos son circulares, al igual que la mayoría de los plásmidos y los de algunos virus. Casi todas las etapas de replicación son idénticas con independencia de que el cromosoma sea circular o lineal. Sin embargo, existe un problema con la replicación de los elementos genéticos lineales que no ocurre con los circulares, y que se encuentra en el extremo 5'de cada cadena. Para entender el problema nos referiremos a la Figura 7.15. Imagine que el extremo izquierdo del DNA representado en este diagrama es realmente el extremo de un cromosoma lineal. Incluso si el RNA iniciador fuera muy corto y existiera una enzima especial que lo eliminara, ninguna DNA polimerasa podría reemplazarlo con DNA, ya que *todas* las DNA polimerasas requieren un iniciador. Por tanto, si no ocurre algo especial, la molécula de DNA será más corta cada vez que se replique. ¡Los elementos genéticos lineales han resuelto perfectamente este problema!

De hecho, existen muchas soluciones al mismo. Algunos virus que poseen cromosomas lineales se circularizan utilizando sus extremos cohesivos, como se indica en la Figura 7.7. Otros virus tienen repeticiones directas en ambos extremos de sus cromosomas. Un proceso de recombinación (unión de diferentes moléculas de DNA) usa las repeticiones para unir varias moléculas de DNA parcialmente replicadas en una molécula muy larga, de la cual se originan copias perfectas tras el corte por una endonucleasa (*véase* Sección 9.9). Varios tipos de virus y muchos plásmidos lineales resuelven el problema de replicar DNA lineal, utilizando como iniciador una *proteína* en lugar de *RNA*. Aunque todas las DNA polimerasas deben añadir cada nucleótido a un grupo OH libre, algunas DNA polimerasas pueden añadir la primera base a un grupo OH de las proteínas específicas que se unen a los extremos de estos cromosomas lineales (Figura 7.24). Estas proteínas están codificadas por el plásmido o el virus, y funcionan reconociendo los extremos de los cromosomas. Estos iniciadores proteicos no se eliminan, de manera que estos tipos particulares de plásmidos o virus tienen proteínas covalentemente unidas a los extremos 5′ de sus DNAs. Éste puede ser también el mecanismo de replicación de los cromosomas lineales de *Bacteria*, tales como el de *Streptomyces lividans*.

Ninguno de estos métodos de replicar DNA lineal se usa para completar los extremos de los cromosomas eucarióticos (telómeros). Los telómeros de los cromosomas eucarióticos contienen DNA repetitivo: una corta secuencia (frecuentemente seis pares de bases) repetida entre 20 y varios cientos de veces (Figura 7.25*a*). Las secuencias de diferentes eucariotas están estrechamente relacionadas y una cadena tiene siempre varias guaninas. Esta secuencia rica en guaninas puede ser añadida al extremo 3′ de una molécula de DNA lineal por una interesante enzima denominada **telomerasa** (*véase* Figura 7.25). Las telomerasas elongan los extremos 3′ de un DNA lineal. *No necesitan DNA molde porque contienen un pequeño RNA molde como cofactor.* Estas enzimas pueden actuar repetidamente para extender progresivamente la cadena. Una vez que la extensión es suficientemente larga, la otra cadena puede ser iniciada con un RNA de la manera usual. Los telómeros no necesitan un número preciso de repeticiones, sino una longitud suficiente para asegurar que no se pierde información genética durante la replicación del DNA.

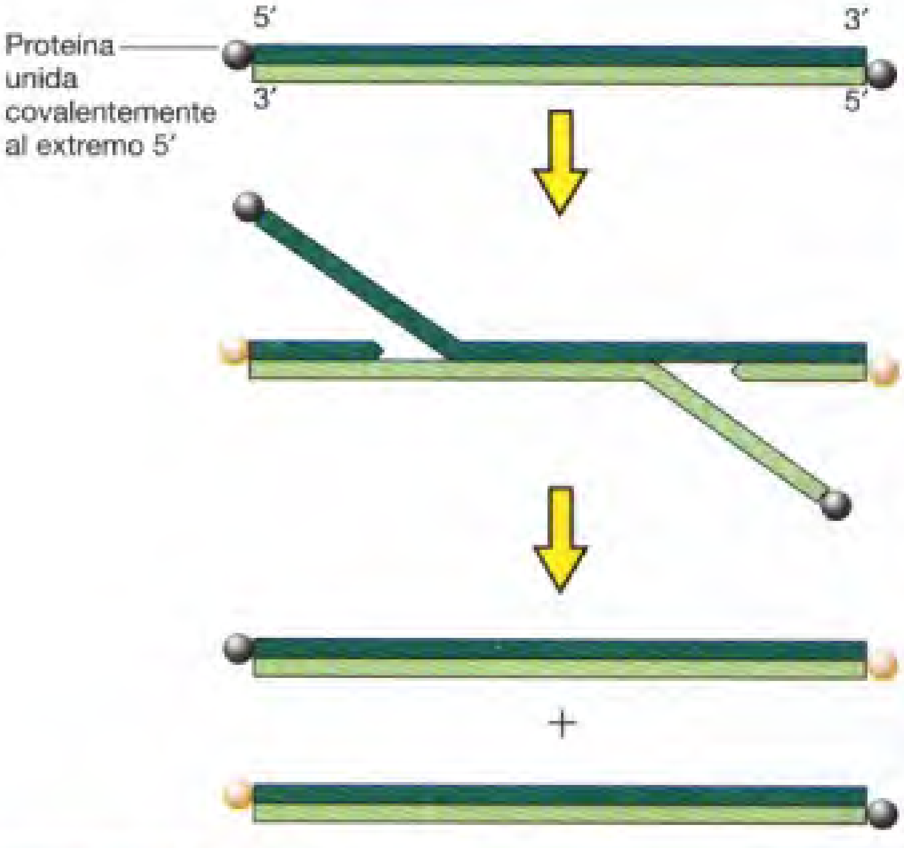


Figura 7.24 Replicación de DNA lineal usando iniciadores proteicos. Las nuevas cadenas de DNA se inician por proteínas que permanecen covalentemente unidas a los extremos 5′.

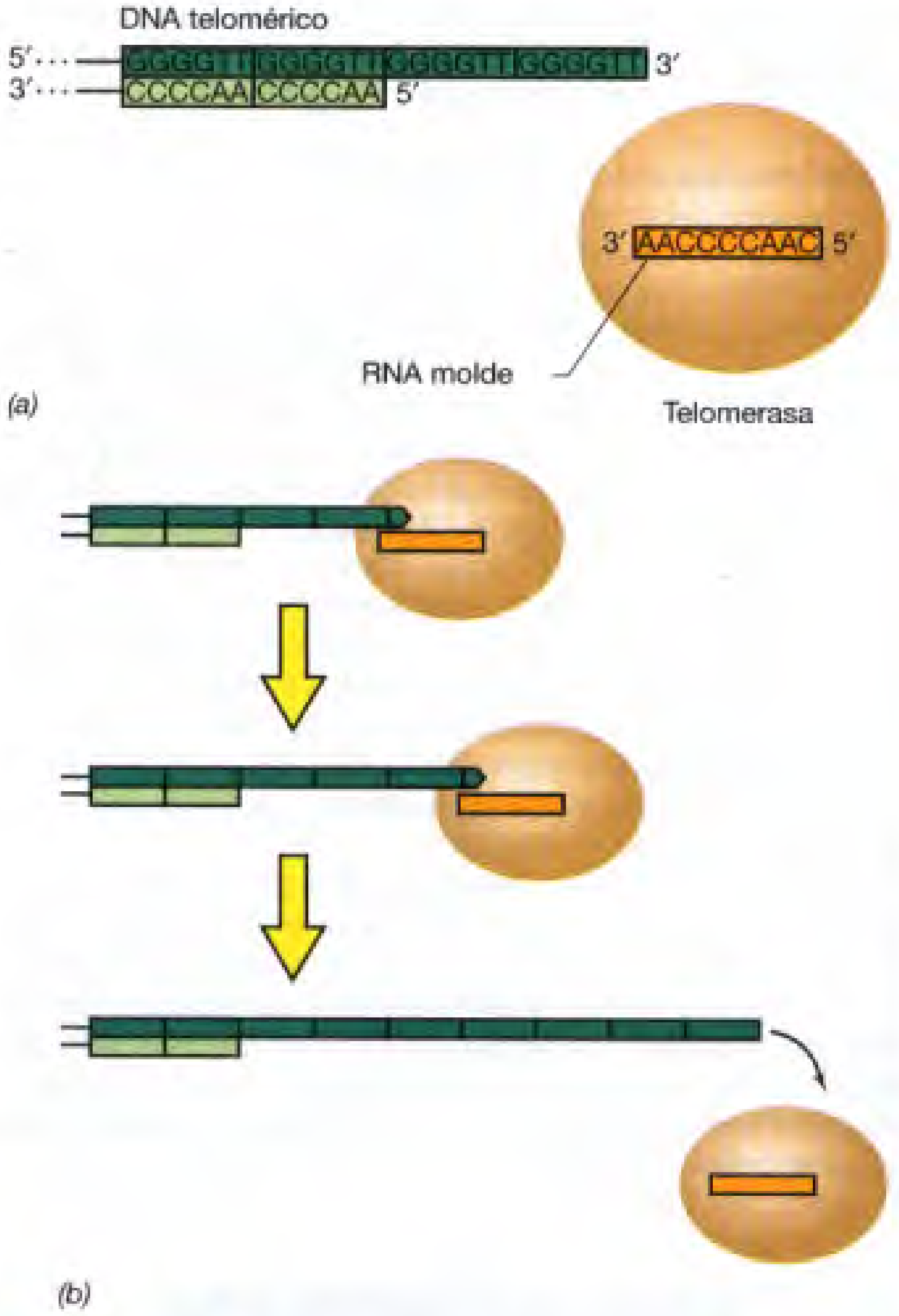


Figura 7.25 Modelo de la acción de la telomerasa en un extremo de un cromosoma eucariótico. (a) Un diagrama de la secuencia del extremo del DNA de un telómero, con cuatro repeticiones ricas en guanina, y la enzima telomerasa que contiene un pequeño RNA molde. (b) Etapas en la elongación de la cadena rica en guanina catalizada por la telomerasa. Cuando la telomerasa termina, la cadena retardada debe ser primada con RNA iniciador por la primasa (no mostrado) seguido por la síntesis de la cadena retardada por la DNA polimerasa y ligasa.

✓ 7.7 Revisión de conceptos

Los extremos de los elementos genéticos lineales representan un problema para la maquinaria de replicación que no existe en los elementos circulares. Algunos elementos procarióticos lineales resuelven el problema utilizando una proteína como iniciador. Los eucariotas han resuelto el problema utilizando una enzima especial denominada telomerasa para extender una cadena del DNA.

- ✓ ¿Qué es un iniciador proteico?
- ✓ ¿Qué es la telomerasa?

IV SÍNTESIS Y PROCESAMIENTO DEL RNA

El ácido ribonucleico (RNA) tiene varias funciones importantes en la expresión de la información genética en la célula. Se han reconocido tres tipos importantes de RNA: **RNA mensajero (mRNA), RNA de transferencia (tRNA)** y **RNA ribosómico (rRNA).** Todos ellos son producto de la *transcripción* de la información genética presente en el DNA del organismo. Existen tres diferencias fundamentales entre la química del RNA y la del DNA: (1) el RNA tiene *ribosa* en lugar de *desoxirribosa*; (2) el RNA tiene la base *uracilo* en lugar de la base *timina;* y (3) excepto en ciertos virus, el RNA no es de doble cadena. El cambio de *desoxirribosa* a *ribosa* afecta a alguna de las propiedades químicas del ácido nucleico, y las enzimas que afectan al DNA generalmente no tienen efecto en el RNA, y viceversa. El cambio de *timina* a *uracilo* no afecta al apareamiento de bases, ya que ambos nucleótidos se aparean bien con la adenina.

Debemos resaltar que el RNA actúa a dos niveles, genético y funcional. A nivel *genético*, el RNA puede transportar la información genética presente en el DNA (mRNA) (o en el caso de algunos virus RNA, tiene una función genética directamente). A nivel funcional, el RNA actúa como una macromolécula por derecho propio, teniendo una función estructural y funcional en los ribosomas (rRNA) o en la transferencia de aminoácidos durante la síntesis de proteínas (tRNA). Algunos RNAs tienen, incluso, propiedades catalíticas (enzimáticas). En esta sección veremos cómo se sintetiza el RNA.

7.8 Generalidades sobre la transcripción

La transcripción de la información genética de DNA a RNA se lleva a cabo por la acción de la enzima **RNA polimerasa**, que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre ribonucleótidos. La RNA polimerasa requiere un molde de DNA. Los precursores del RNA son los ribonucleósido trifosfato ATP, GTP, UTP y CTP. La química de la síntesis de RNA es similar a la de la síntesis de DNA (*véase* Figura 7.14). Durante la elongación de la cadena de RNA, se añaden ribonucleótidos al 3′-OH de la ribosa del nucleótido precedente, que se polimerizan mediante la liberación de dos enlaces de alta energía. Así, en la síntesis de RNA (como en la síntesis de DNA), la dirección de la cadena naciente es del extremo 5′ al 3′, y la cadena *molde* es antiparalela. A diferencia de la DNA polimerasa, *la RNA polimerasa puede comenzar las cadenas* (el nucleótido inicial de la cadena de RNA retiene los tres fosfatos). La primera base en el RNA es siempre una purina, ya sea adenina o guanina.

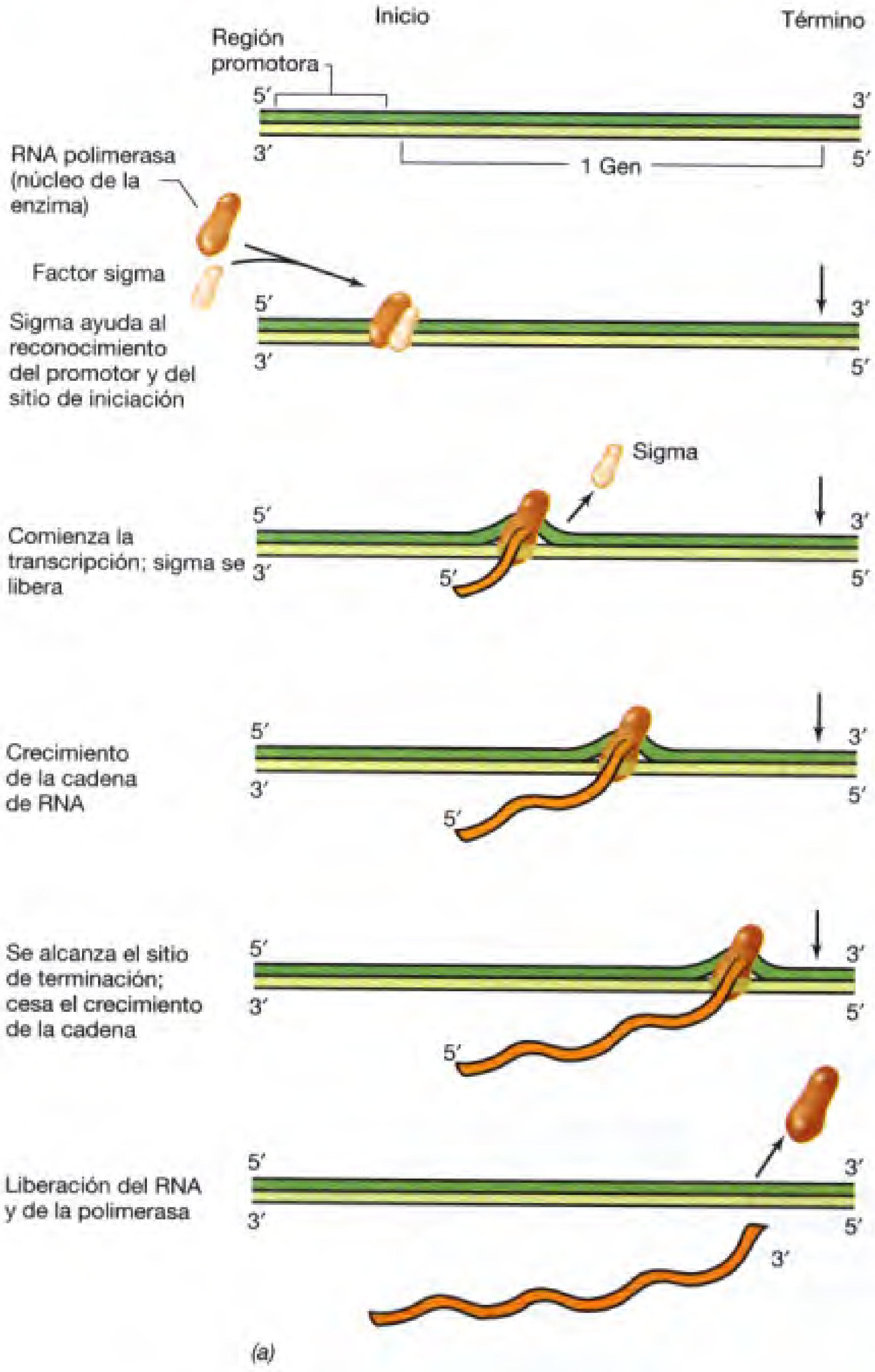
En la mayoría de los casos, el DNA molde utilizado por la RNA polimerasa es un DNA bicatenario, pero para un gen determinado sólo se transcribe una de las cadenas. Mientras estos principios son válidos para las RNA polimerasas de todos los organismos, las RNA polimerasas de *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya* difieren claramente entre sí. *Bacteria* y *Archaea* poseen una única RNA polimerasa, mientras que los núcleos de eucariotas poseen tres enzimas: RNA polimerasa I, RNA polimerasa II y RNA polimerasa III. Todas son enzimas multiméricas y todas contienen algunas subunidades evolutivamente conservadas (*véase* Figura 11.16). La siguiente descripción versará exclusivamente sobre la RNA polimerasa de *Bacteria*, que tiene la estructura más simple (y es la más conocida).

Todas las RNA polimerasas de *Bacteria* que se han estudiado son enzimas complejas que poseen diferentes subunidades claramente relacionadas. La enzima de *Escherichia coli* tiene cuatro tipos de subunidades, designadas β, β', α y σ (sigma), estando α presente en dos copias. Las subunidades interaccionan para formar una enzima activa, llamada *holoenzima*, aunque el factor sigma no está tan fuertemente unido como el resto y se disocia fácilmente, originando lo que se conoce como el *núcleo (core) de la enzima* ($\alpha_2\beta\beta'$). (Curiosamente, son las subunidades del núcleo las que están conservadas en *Archaea* y *Eukarya*.) El núcleo puede, por sí solo, catalizar la formación de RNA, y la función de sigma consiste en el *reconocimiento* del sitio apropiado en el DNA para la iniciación de la síntesis de RNA. El proceso de síntesis de RNA que implica a la RNA polimerasa y a sigma se ilustra en la Figura 7.26.

La RNA polimerasa es una enzima enorme y contacta simultáneamente con muchas bases del DNA. Como se ha indicado (*véase* Sección 7.2), las proteínas pueden interaccionar específicamente con el DNA debido a que ciertas regiones de los pares de bases se exponen en el surco principal. Para *comenzar* la síntesis de una cadena de RNA correctamente, la RNA polimerasa debe reconocer primero la región del DNA apropiada. Estos sitios particulares del DNA a los que se une la RNA polimerasa se denominan **promotores**. Nótese que sólo *una* de las dos cadenas del DNA se transcribe cada vez. La cadena que debe transcribirse está determinada por la orientación de la secuencia del promotor. La RNA polimerasa sintetiza RNA a medida que se mueve alejándose del promotor.

Una vez que se une la RNA polimerasa, puede comenzar el proceso de transcripción. En este proceso, la doble hélice del DNA *es abierta* por la RNA polimerasa (Figura 7.26). A medida que la polimerasa se mueve, produce el desenrollamiento de segmentos cortos, los cuales se transcriben y posteriormente se cierran de nuevo. Como resultado de este desenrollamiento transitorio, las bases de la cadena molde quedan *expuestas* y se copian al RNA complementario. Así, el promotor *orienta* a la RNA polimerasa en una u otra dirección. Cuando una región del DNA posee dos promotores orientados en direcciones opuestas, la transcripción desde uno de esos promotores se produce en una dirección (en una de las cadenas) y la transcripción desde el otro se produce en la dirección opuesta (en la otra cadena) (*véase* Figura 15.4).

Una vez que se sintetiza una pequeña porción de RNA, el factor sigma se disocia; la mayor parte de la elongación se lleva a cabo exclusivamente por el núcleo de la enzima (Figura 7.26). Análogamente, el factor sigma está implica-


Inicio
Término
Región promotora
5′
3′
3′
5′
1 Gen
RNA polimerasa (núcleo de la enzima)
Factor sigma
Sigma ayuda al reconocimiento del promotor y del sitio de iniciación
Sigma
Comienza la transcripción; sigma se libera
Crecimiento de la cadena de RNA
Se alcanza el sitio de terminación; cesa el crecimiento de la cadena
Liberación del RNA y de la polimerasa
(a)

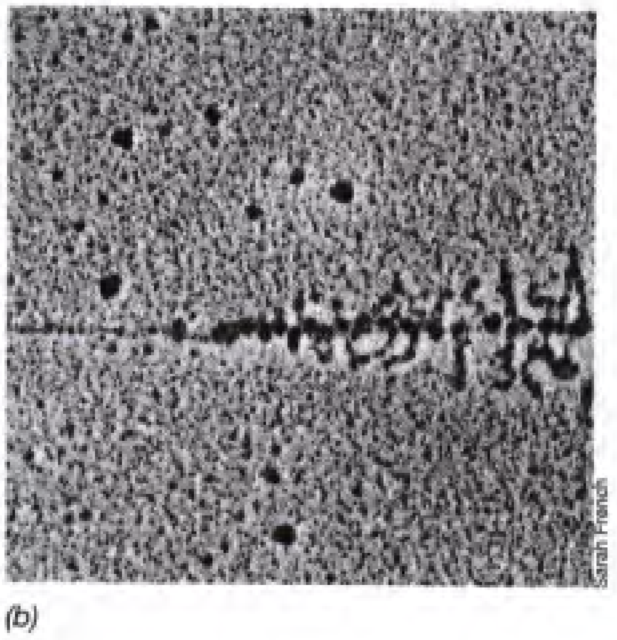

Sarah French
(b)

Figura 7.26 Transcripción. (a) Etapas de la síntesis de un RNA mensajero. Los sitios de iniciación y terminación son secuencias de nucleótidos específicas del DNA. La RNA polimerasa se mueve sobre el DNA alejándose del promotor, causando una separación transitoria de la doble hélice y la transcripción de una de las cadenas. Cuando se alcanza el sitio de terminación, se detiene el crecimiento de la cadena, y el mRNA y la polimersa se liberan. (b) Micrografía electrónica del proceso de transcripción de un gen determinado del cromosoma de *Escherichia coli*. La región de transcripción activa representa unos 2 kilopares de bases en el DNA. La transcripción tiene lugar de izquierda a derecha.

do exclusivamente en la iniciación del complejo DNA-RNA polimerasa. A medida que el RNA sintetizado se disocia del DNA, el DNA abierto se cierra y regresa a la doble hélice original. La transcripción se detiene en regiones específicas denominadas **terminadores de la transcripción**.

Por tanto, a diferencia de la replicación, que implica copiar un genoma entero, la transcripción se circunscribe a unidades mucho más pequeñas del DNA, frecuentemente a un único gen. Esto hace que la célula transcriba diferentes genes a frecuencias muy diferentes. Como veremos en el Capítulo 8, la regulación de la transcripción de genes específicos puede constituir un mecanismo muy eficaz para controlar la expresión génica.

✓ 7.8 Revisión de conceptos

Los tres tipos principales de RNA son el RNA mensajero (mRNA), RNA de transferencia (tRNA) y RNA ribosómico (rRNA). La transcripción de RNA a partir de DNA necesita la enzima RNA polimerasa, la cual añade bases a los extremos 3′ de las cadenas nacientes. A diferencia de la DNA polimerasa, la RNA polimerasa puede comenzar una cadena. La RNA polimerasa reconoce un sitio específico de inicio en la molécula de DNA llamada promotor. La síntesis de RNA finaliza en un terminador de la transcripción.

- ✓ ¿Qué es un promotor?
- ✓ ¿Qué es un terminador de la trancripción?

7.9 Promotores

Como hemos mencionado, el promotor tiene una función clave en la iniciación de la síntesis de RNA. Los promotores son secuencias específicas de DNA a las que se unen las RNA polimerasas. Se han determinado las secuencias de un gran número de promotores de diversos organismos. La Figura 7.27 muestra la secuencia de unos cuantos promotores de *Escherichia coli*. El factor sigma es la parte de la RNA polimerasa implicada en el reconocimiento de estos promotores.

Un organismo determinado puede tener varios factores sigma diferentes; *E. coli* codifica 7, *Bacillus subtilis* codifica 17. Estos factores sigma alternativos permiten a la RNA polimerasa reconocer diferentes tipos (secuencias) de promotores. Incluso así, en una determinada bacteria la mayoría de los genes requieren una especie única de factor sigma.

Todas las secuencias de la Figura 7.27 son reconocidas por el mismo factor sigma, el factor sigma mayoritario de *E. coli*. Si se examinan las secuencias, se observará que no son idénticas. Sin embargo, dentro de la región promotora hay dos secuencias altamente conservadas en todos los promotores, que son las reconocidas por sigma. Ambas secuencias preceden (están *antes*) al sitio de comienzo de la transcripción. Una es una región de 10 bases antes del comienzo de la transcripción, la región –10 (llamada *caja Pribnow*). Nótese que aunque cada promotor es ligeramente diferente, muchas bases no cambian. Cuando se comparan las regiones –10 de todos los promotores reconocidos por este sigma, para determinar la base que se encuentra con más frecuencia en cada posición, se obtiene la secuencia consenso TATAAT. En nuestro ejemplo, cada promotor tiene de tres a cinco coincidencias con esta secuencia consenso. La segunda región de secuencia conservada está a 35 bases del comienzo de la transcripción. La secuencia consenso para esta región es TTGACA. De nuevo, la mayoría de las secuencias no coinciden exactamente con la secuencia consenso.

E. coli tiene 7 factores sigma diferentes y cada factor sigma reconoce una secuencia consenso diferente. Por tanto, estos factores sigma dirigirán la RNA polimerasa a promotores con secuencias diferentes de las mostradas en la Figura 7.27. En su mayoría, estos promotores estarán asociados con diferentes genes (aunque algunos genes tienen más de un promotor). Nótese que en la Figura 7.27 se representa la secuencia de una sola cadena. Los genéticos han acordado que la cadena mostrada sea la que posee su extremo 5′ antes del comienzo de la transcripción (por tanto, no es la cadena utilizada como molde por la RNA polimerasa). Sólo se muestra la secuencia de una cadena simplemente para ahorrar el espacio que ocuparía la otra. No obstante, es esencial recordar que los promotores son bicatenarios; esto es, la RNA polimerasa reconoce y se une a DNA de doble cadena. No obstante, sólo una de las cadenas servirá como molde durante la transcripción.

Otros factores sigma de otros organismos son algunas veces más específicos; se deja poco margen de variación a

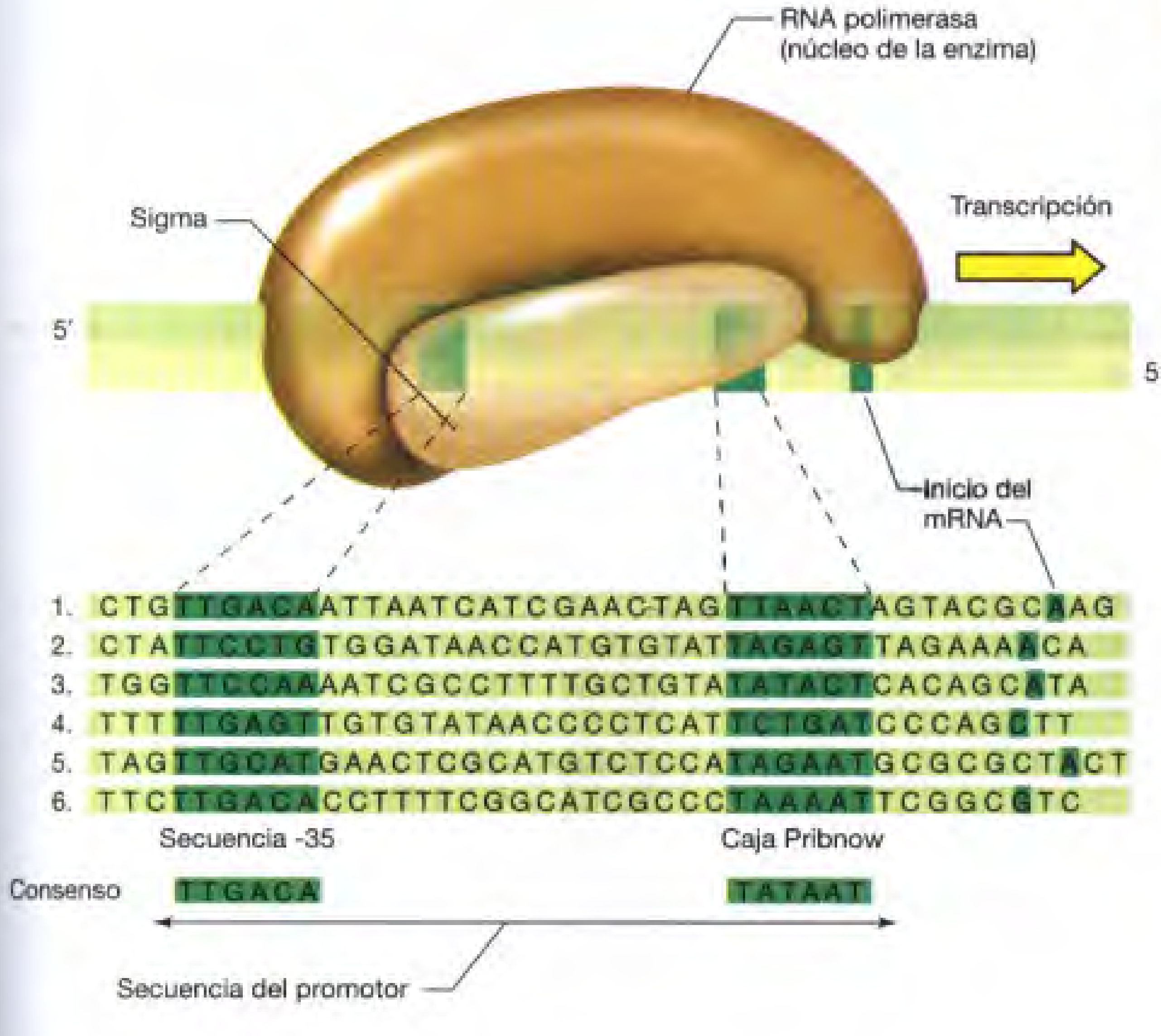

RNA polimerasa
(núcleo de la enzima)
Sigma
Transcripción
5′
5′
Inicio del
mRNA
1. CTGTTGACAATTAATCATCGAACTAGTTAACTAGTACGCAAG
2. CTATTCCTGTGGATAACCATGTGTATTAGAGTTAGAAAACA
3. TGGTTCCAAAATCGCCTTTTGCTGTATATACTCACAGCATA
4. TTTTTGAGTTGTGTATAACCCCTCATTCTGATCCCAGCTT
5. TAGTTGCATGAACTCGCATGTCTCCATAGAATGCGCGCTACT
6. TTCTTGACACCTTTTCGGCATCGCCCTAAAATTCGGCGTC
Secuencia -35
Caja Pribnow
Consenso
TTGACA
TATAAT
Secuencia del promotor

Figura 7.27 Interacción de la RNA polimerasa con el promotor. Debajo del diagrama se muestran seis secuencias promotoras diferentes identificadas en *Escherichia coli*. Se indican los contactos de la RNA polimerasa con la secuencia –35 y la caja Pribnow. La transcripción comienza en una base determinada situada tras la caja Pribnow. Debajo de las secuencias reales de las regiones –35 y Pribnow se muestran las secuencias consenso derivadas de la comparación de muchos promotores.

las bases críticas que son reconocidas. En *E. coli*, los promotores que se parecen más a la secuencia consenso son generalmente más efectivos uniendo la RNA polimerasa. Los promotores más efectivos se denominan *promotores fuertes* y tienen un considerable valor en ingeniería genética, como veremos en el Capítulo 31.

Recuérdese que los núcleos de los eucariotas contienen tres RNA polimerasas diferentes. Cada una de estas enzimas reconoce un promotor que está asociado con un tipo particular de gen. La **RNA polimerasa I** *sintetiza la mayoría de los tipos de rRNA;* la **RNA polimerasa II** *sintetiza todo el mRNA*, y la **RNA polimerasa III** *sintetiza tRNA* (y un tipo de rRNA). La razón de esta especificidad es que cada tipo de RNA polimerasa sólo reconoce los promotores asociados con cada clase de gen particular. Al igual que ocurre en *Bacteria*, la mayoría de los genes de eucariotas codifican proteínas y, por tanto, son transcritos por la RNA polimerasa II. Las RNA polimerasas de eucariotas también requieren factores especiales accesorios para reconocer promotores específicos pero, a diferencia de *Bacteria*, los factores de iniciación eucarióticos (y los de *Archaea*) reconocen los elementos del promotor independientemente, no como parte de una holoenzima de polimerasa. Aunque las *Archaea* tienen, como las *Bacteria*, una sola RNA polimerasa, ésta está íntimamente relacionada con las enzimas eucarióticas.

✓ 7.9 Revisión de conceptos

En *Bacteria*, los promotores son reconocidos por la subunidad sigma de la RNA polimerasa. Los promotores reconocidos por un factor sigma determinado tienen secuencias muy similares. En *Eukarya*, las principales clases de RNA se transcriben por diferentes RNA polimerasas.

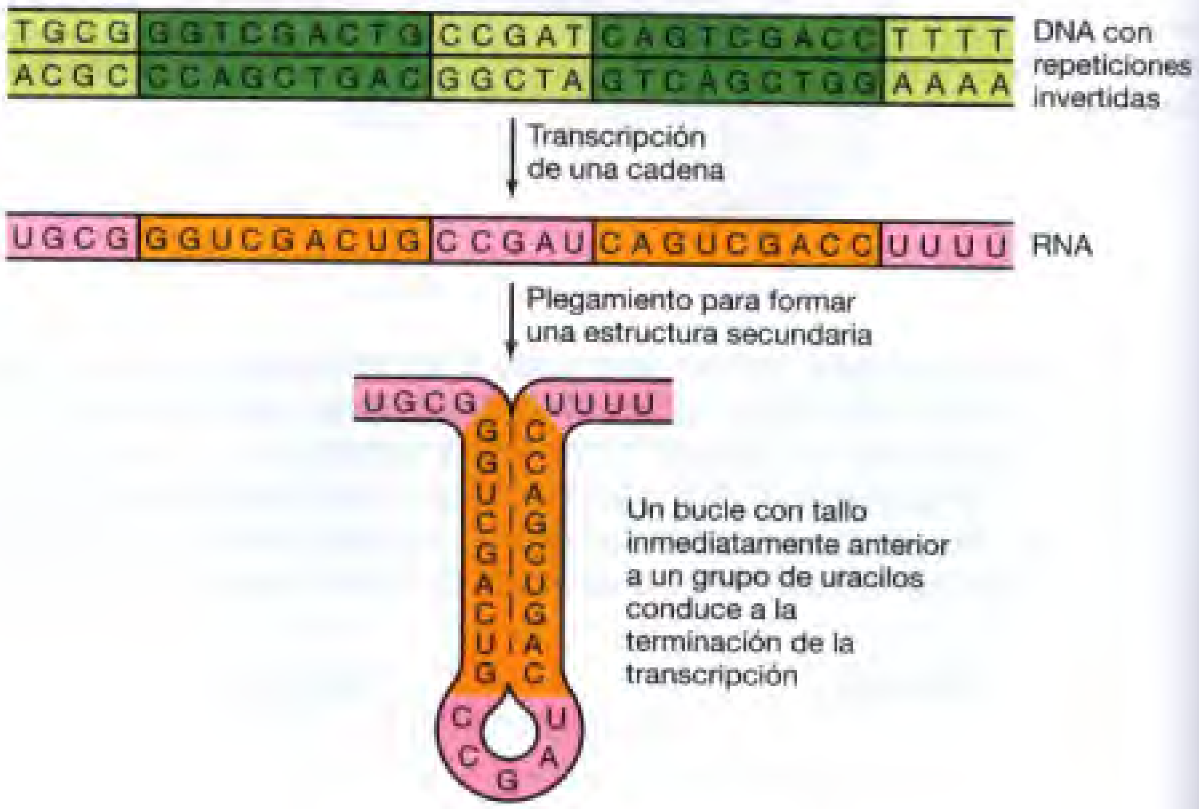
- ✓ ¿Qué es una *secuencia consenso*?
- ✓ ¿Qué tipo de RNA polimerasa transcribe los genes que codifican proteínas en un eucariota?

7.10 Terminadores de la transcripción

Tan importante como el inicio de la transcripción es su *terminación*. La **terminación** de la síntesis de RNA tiene lugar en secuencias de bases específicas en el DNA. En *Bacteria* una secuencia de terminación habitual es una secuencia que contiene una repetición invertida con un segmento central no repetido (*véanse* Sección 7.2 y Figura 7.6). Cuando se transcribe una secuencia de DNA como ésta, el RNA forma un bucle en forma de horquilla por apareamiento intracatenario de bases (Figura 7.28). Cuando tales estructuras de bucles con forma de horquilla *en el RNA* van seguidos por varias uridinas, se convierten en terminadores eficaces de la transcripción. Otros sitios de terminación son regiones donde una secuencia rica en GC es seguida por otra región rica en AT. Tales tipos de secuencias producen la terminación sin necesidad de factores extra adicionales, y se denominan a veces *terminadores intrínsecos*.

Se han descubierto otros tipos de secuencias terminadoras que requieren factores proteicos específicos, además de RNA polimerasa, para su funcionamiento. En *Escherichia coli* un tipo de terminador de la transcripción requiere una proteína denominada *Rho*. Rho no se une a la RNA polimerasa ni al DNA, pero se une fuertemente al RNA y acerca la cadena de RNA al complejo DNA-RNA polimerasa. Una vez que la RNA polimerasa se ha detenido en un *sitio de terminación dependiente de Rho*, Rho hace que tanto el RNA como la RNA polimerasa abandonen el DNA, terminando así la transcripción. Otras proteínas implicadas en la terminación de la transcripción son, al igual que Rho, proteínas que se unen al RNA. En todos los casos, las secuencias implicadas en la terminación operan a nivel de RNA. Sin embargo, debemos recordar que el RNA se transcribe del DNA y, por tanto, la terminación de la transcripción está determinada en último término por *secuencias específicas de nucleótidos en el DNA*.

Figura 7.28 Las repeticiones invertidas en el DNA transcrito conducen a la formación de estructuras en forma de bucle con tallo en el RNA, que pueden causar la terminación de la transcripción.


TGCG GGTCGACTG CCGAT CAGTCGACC TTTT
ACGC CCAGCTGAC GGCTA GTCAGCTGG AAAA
DNA con repeticiones invertidas
Transcripción de una cadena
UGCG GGUCGACUG CCGAU CAGUCGACC UUUU
RNA
Plegamiento para formar una estructura secundaria
UGCG
UUUU
G G U C G A C U G
C C A G C U G A C
C C G A U
Un bucle con tallo inmediatamente anterior a un grupo de uracilos conduce a la terminación de la transcripción

La terminación de la transcripción no se ha estudiado bien en *Archaea* y *Eukarya*. En los genes transcritos por la RNA polimerasa II eucariótica, parece existir una conexión entre la terminación de la transcripción y un suceso de procesamiento que tiene lugar en el extremo 3′ del RNA (*véase* Sección 7.12).

Se sabe menos sobre las señales de terminación de la transcripción en *Archaea*, pero en algunos genes parece claro que están implicadas las repeticiones invertidas seguidas por una secuencia rica en AT, secuencias similares a las encontradas en muchos terminadores de transcripción bacterianos. Sin embargo, tales secuencias no se encuentran en otros genes de arqueas. Otro tipo posible de terminador de la transcripción no contiene repeticiones invertidas, sino que es la secuencia de nucleótidos la que contiene fragmentos repetidos, cada uno compuesto de un poliT.

✓ 7.10 Revisión de conceptos

La RNA polimerasa detiene la transcripción en lugares específicos denominados terminadores de la transcripción. Aunque codificados por el DNA, estas señales funcionan a nivel del RNA. Algunos son terminadores intrínsecos y no requieren proteínas accesorias, aparte de la polimerasa. En *Bacteria*, estas secuencias usan frecuentemente bucles con forma de horquilla seguidos de un poliU.

✓ ¿Qué es un *terminador intrínseco*?

✓ ¿Qué es una *estructura en bucles con forma de horquilla*?

7.11 La unidad de transcripción

Los cromosomas están organizados en unidades delimitadas por las regiones en las que se inicia y se termina la transcripción de DNA en RNA: unidades de transcripción. Podría asumirse que cada unidad de transcripción es un único gen, aunque no siempre ocurre así. Algunas unidades de transcripción contienen dos o más genes. Estos genes se *cotranscriben*, originando una única molécula de RNA.

Como se vio en la Sección 7.1, la mayoría de los genes codifican proteínas, pero otros codifican RNAs que no son traducidos, tales como RNA ribosómico (rRNA) y RNA de transferencia (tRNA). Existen varios tipos de rRNA en un organismo (teniendo cada ribosoma una copia de cada tipo; *véase* Sección 7.15). Los procariotas tienen tres tipos: rRNA 16S, rRNA 23S y rRNA 5S. Como se muestra en la Figura 7.29, existen agrupaciones de genes que contienen un gen para cada uno de estos RNAs, y los genes del grupo se cotranscriben. Una situación similar ocurre en eucariotas (aunque uno de los tipos de rRNA eucarióticos no se encuentra en tales agrupaciones). Por tanto, en todos los organismos, la unidad de transcripción de la mayoría de los rRNA contiene más de un gen. En procariotas, los genes tRNA son cotranscritos frecuentemente con otros genes tRNA, e incluso, como se indica en la Figura 7.29, con genes rRNA. Todos estos transcritos deben ser procesados para originar los rRNA y tRNA maduros (*véase* Sección 7.12).

Recuérdese que los genes que codifican proteínas lo hacen a través de un intermediario llamado RNA mensajero (mRNA). En procariotas y en eucariotas, la mayoría del mRNA es inestable y se degrada por nucleasas celulares. Esto contrasta con el rRNA y el tRNA, que son a veces conocidos como RNA estable. En procariotas, una única molécula de mRNA frecuentemente codifica más de una proteína (*véase* Figura 7.2). En los elementos genéticos *procarióticos*, los genes que codifican enzimas relacionadas están frecuentemente agrupados (*véase* Figura 10.48). En estas situaciones, la RNA polimerasa procede a lo largo de la cadena y transcribe una serie de genes en una única y larga molécula de mRNA. Un mRNA que codifica tal grupo de genes que se cotranscriben se denomina **mRNA policistrónico** (*véase* Sección 10.10). Posteriormente, cuando este

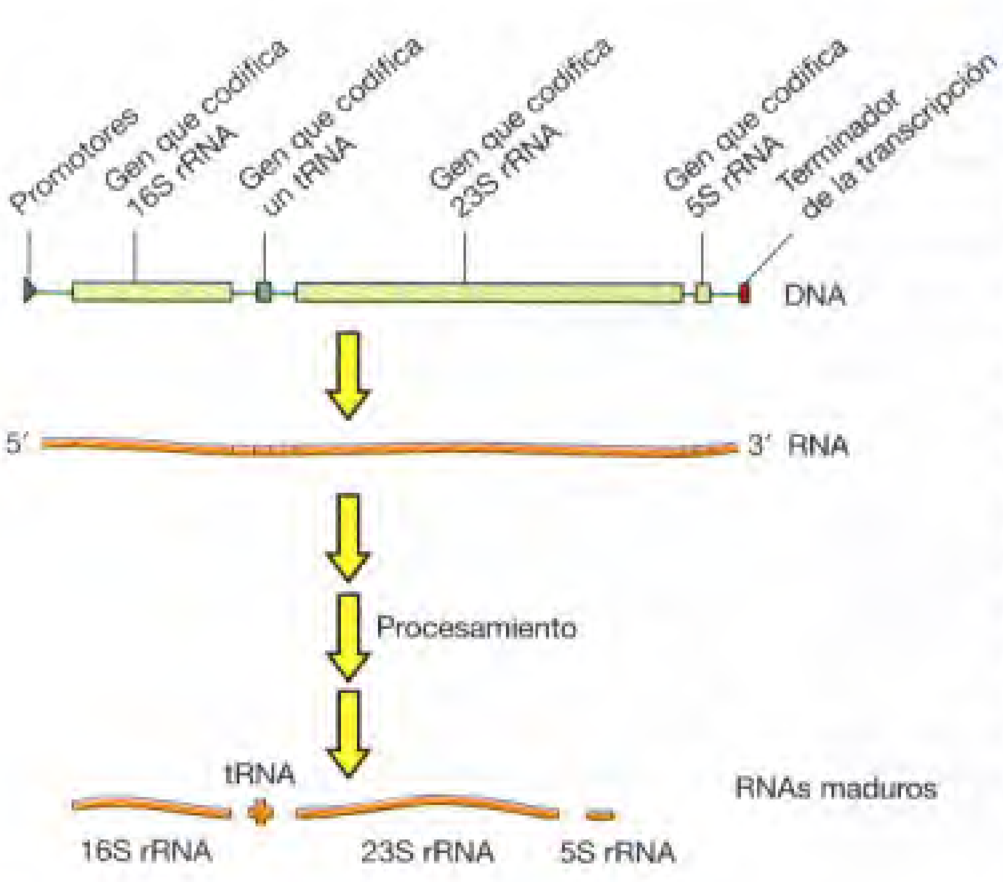


Figura 7.29 Transcripción de una unidad de RNA ribosómico (rRNA) en *Bacteria*. Este tipo de unidad transcripcional se llama «operón rRNA». En *Bacteria*, todos estos operones contienen los genes de los rRNAs, en el orden 16S rRNA, 23S rRNA, y 5S rRNA (que se muestran aproximadamente a escala). Nótese que, en este operón particular, el espaciador entre los genes 16S y 23S rRNA contienen un gen tRNA. En otros operones, esta región puede contener más de un gen tRNA y a menudo el gen 5S rRNA va seguido de uno o más genes tRNA que también se cotranscriben. *Escherichia coli* contiene 7 de tales operones. En eucariotas, los genes de RNAs no ribosómicos no se encuentras en tales unidades.

RNA policistrónico participa en la síntesis de proteínas (*véase* Sección 7.15), pueden sintetizarse a la vez varios polipéptidos codificados por un único RNA.

Describiremos la regulación de la síntesis de mRNA en el Capítulo 8, pero introduciremos aquí el concepto de operón. Un **operón** es una unidad de expresión génica completa, que a menudo implica genes que codifican varios polipéptidos en un mRNA policistrónico o genes que codifican para rRNA. En algunos casos, la transcripción del mRNA del operón está bajo el control de una región específica del DNA adyacente a la región codificante del primer gen del operón, el **operador**. Como veremos en el Capítulo 8, el operador funciona a través de la unión de ciertas proteínas reguladoras.

En general, los mRNA policistrónicos no existen en eucariotas. Sin embargo, esto se debe a diferencias en la *traducción*, no en la transcripción. Veremos estas diferencias más adelante en este capítulo después de revisar las etapas adicionales requeridas para convertir el transcrito de un gen eucariótico que codifica una proteína en un mRNA funcional.

✓ 7.11 Revisión de conceptos

Las unidades de transcripción contienen frecuentemente más de un gen. En procariotas puede tener lugar la transcripción de varios genes en una única molécula de mRNA, de manera que el mRNA puede contener información para más de un polipéptido. Tales genes, que son transcritos juntos a partir de un único promotor, constituyen un operón. Los genes que codifican rRNA son cotranscritos tanto en procariotas como en eucariotas.

- ✓ ¿Qué es un *RNA mensajero*?
- ✓ ¿Qué es un *mRNA policistrónico*?

7.12 Procesamiento del RNA y ribozimas

Como hemos comentado (*véase* Sección 7.8), la transcripción puede producir varios tipos de RNA: RNA mensajero, RNA de transferencia, y RNA ribosómico. Recuérdese que cada uno de estos tipos de RNA tiene una importante función en la célula. Sin embargo, para ser funcionales, muchos de estos RNAs deben ser primero procesados a una forma madura después de transcribirse. En realidad, el único RNA funcional que es el producto directo de la transcripción es el mRNA de procariotas. El resto de los RNAs requiere algún tipo de procesamiento. El **procesamiento del RNA** es la conversión de un *RNA precursor* a un *RNA maduro*. Existen tipos muy diferentes de procesamiento.

En procariotas y eucariotas, los tRNAs y rRNAs son sintetizados como largas moléculas precursoras que son luego cortadas para originar el RNA maduro final (*véase* Figura 7.29). Además, muchas de las bases en el tRNA son modificadas después de la transcripción.

En eucariotas, y mucho menos frecuentemente en procariotas, el mRNA es el resultado del procesamiento de un pre-mRNA. Como vimos en la Sección 7.4, los genes de eucariotas están a menudo interrumpidos por secuencias no codificadoras, *intrones*, que separan las regiones codificadoras, *exones*. El *transcrito primario* de un gen escindido debe ser procesado para separar las regiones no codificadoras antes de que se inicie el proceso de traducción. En procariotas y en algún bacteriófago, sólo se han descubierto unos pocos genes con intrones. La etapa del procesamiento, por la cual se eliminan los intrones se denomina **procesamiento** o **proceso de corte y empalme (*splicing*)**.

Aunque los intrones se han encontrado en diferentes tipos de genes en procariotas y eucariotas, la maquinaria de

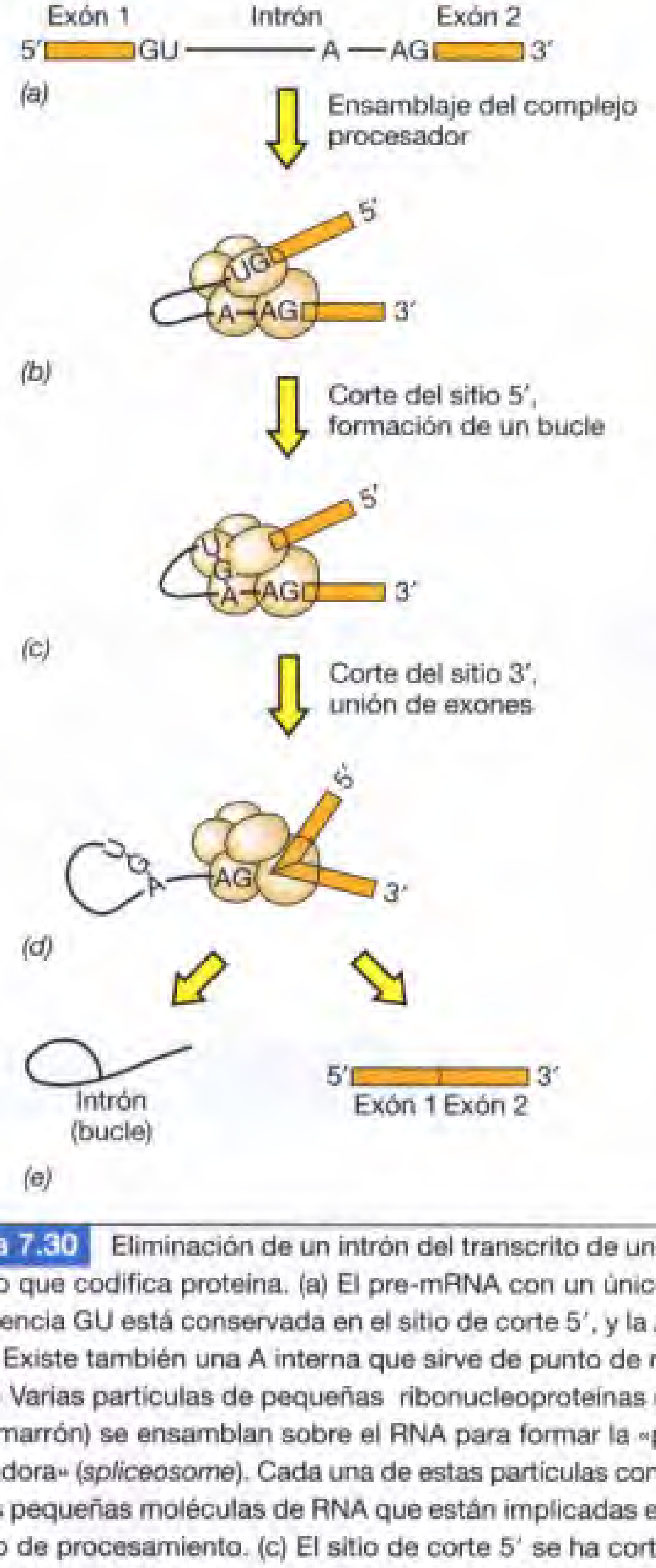

Exón 1
Intrón
Exón 2
5′
GU
A
AG
3′
(a)
Ensamblaje del complejo procesador
5′
UG
A
AG
3′
(b)
Corte del sitio 5′, formación de un bucle
5′
U
G
A
AG
3′
(c)
Corte del sitio 3′, unión de exones
5′
U
G
A
AG
3′
(d)
Intrón (bucle)
5′
3′
Exón 1 Exón 2
(e)

Figura 7.30 Eliminación de un intrón del transcrito de un gen eucariótico que codifica proteína. (a) El pre-mRNA con un único intrón. La secuencia GU está conservada en el sitio de corte 5′, y la AG en el sitio 3′. Existe también una A interna que sirve de punto de ramificación. (b) Varias partículas de pequeñas ribonucleoproteínas (mostradas en marrón) se ensamblan sobre el RNA para formar la «partícula procesadora» (*spliceosome*). Cada una de estas partículas contiene diferentes pequeñas moléculas de RNA que están implicadas en el mecanismo de procesamiento. (c) El sitio de corte 5′ se ha cortado con la formación simultánea de un punto de ramificación. (d) El sitio de corte 3′ ha sido cortado, a la vez que se unen los dos exones. Nótese que en total se han roto dos enlaces fosfodiéster pero se han formado otros dos. (e) Los productos finales son exones unidos, el mRNA, y el intrón eliminado.

corte y empalme que elimina los intrones del pre-mRNA eucariótico es única. El proceso implica un complejo de varias ribonucleoproteínas (estando cada complejo formado por un RNA pequeño y proteínas) llamado **partícula procesadora** (***spliceosome***). Esta partícula tiene una estructura altamente compleja capaz de eliminar intrones y unir los exones adyacentes para formar un mRNA maduro. La Figura 7.30 esquematiza la reacción de dos etapas mediante la cual se elimina un intrón presente en el pre-mRNA de eucariotas como una *estructura en bucle*. Estos intrones eliminados son degradados por la célula. En eucariotas superiores es frecuente encontrar varios intrones en un único gen y es importante no sólo que sean eliminados sino que sean eliminados en el orden correcto. Algunos intrones (en especial los encontrados en los genes tRNA y en genes de las mitocondrias o cloroplastos) son eliminados por un proceso diferente que requiere varias proteínas. Varios intrones, incluyendo todos los que se encuentran en *Bacteria* y bacteriófagos, se *«autocortan y autoempalman»* (ribozimas; *véase* subsección siguiente).

En el procesamiento de los mRNA eucarióticos se producen otras dos etapas únicas. Ambas etapas tienen lugar en el núcleo, antes de que el mRNA maduro sea transportado al citoplasma. La primera etapa se denomina *capping* (literalmente «poner un capuchón») y en realidad ocurre antes de que se complete la transcripción. Consiste en la adición de una guanina metilada al fosfato del extremo 5′. En ocasiones, otros nucleótidos del extremo 5′ del mRNA eucariótico son también modificados.

La última etapa del procesamiento consiste en el corte del extremo 3′ del pre-mRNA y la adición de una *cola de poliA*. Esta etapa se denomina **poliadenilación** y como se ha visto (*véase* Sección 7.10) puede producirse en conjunción con la terminación. Las tres etapas que conducen a la formación del mRNA eucariótico se muestran en la Figura 7.31.

Vemos pues que la síntesis de mRNA maduro y funcional es un proceso complejo y dinámico que implica mucho más que la simple transcripción de un molde de DNA.

Ribozimas

En el Capítulo 3, resaltamos el papel de las proteínas como biocatalizadores biológicos. Muchos procesos importantes implican *ribonucleoproteínas*, unos complejos que constan de RNA y proteína. En alguna ocasión *se asumió* que la función del RNA en estos complejos era estructural (un lugar al que se unían las proteínas) o de apareamiento con otros ácidos nucleicos. Como hemos visto, existe una corta molécula de RNA en la enzima *telomerasa* que funciona como molde. Sin embargo, se ha demostrado que ciertos tipos de RNA pueden funcionar también como *enzimas*. Los RNA catalíticos, denominados **ribozimas**, están implicados en una serie de importantes reacciones celulares. Los RNA actúan, al igual que las proteínas, mediante un «sitio activo» que se une al sustrato y cataliza la formación de un producto (*véase* Sección 5.5). Se han descubierto ribozimas en procariotas y eucariotas, así como en orgánulos, y otras han sido sintetizadas en el laboratorio. Los estudios indican que algunas moléculas cortas de RNA con tan sólo 19 bases pueden funcionar como ribozimas.

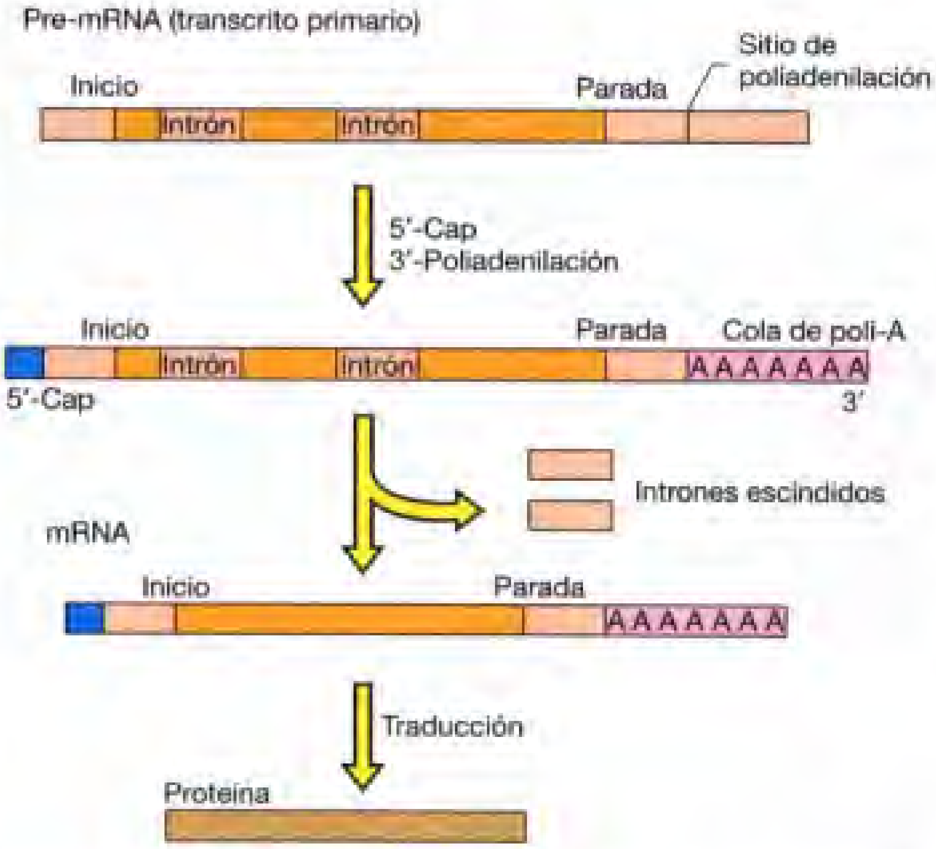


Figura 7.31 Visión general del procesamiento de un pre-mRNA en un mRNA maduro en eucariotas. Las etapas del procesamiento incluyen la adición del cap al extremo 5′, la eliminación de intrones y el corte del extremo 3′ del transcrito a la vez que se añade la cola de poli-A. Todas estas etapas tienen lugar en el núcleo. También se indica la localización de los codones de inicio y de parada que se usarán durante la transcripción.

La mayoría de las ribozimas son **intrones que se autoprocesan** (autocortan y autoensamblan). Son *enzimas procesadoras de RNA* que se liberan de una molécula de RNA a la vez que enlazan los exones adyacentes. En un caso de procesamiento bien estudiado en un RNA ribosómico en *Tetrahymena* (un eucariota), un *intrón* de 413 nucleótidos actúa como ribozima y se autocorta de una molécula precursora mayor de rRNA, uniendo a la vez los dos exones adyacentes para formar el rRNA final (Figura 7.32). La ribozima intrónica actúa como una endorribonucleasa específica de secuencia y, una vez separado del RNA precursor, se circulariza con la eliminación concomitante de un corto oligonucleótido (Figura 7.32). El autoprocesamiento de intrones está ampliamente extendido en la naturaleza y son los únicos tipos conocidos en *Bacteria* y en bacteriófagos. La prueba definitiva de que estas transformaciones ribozímicas ocurren en ausencia de proteínas específicas procede de experimentos en los cuales el gen completo que codifica el rRNA precursor de *Tetrahymena* se ha transferido a *Escherichia coli*, donde el fragmento puede ser transcrito. El segmento transcrito realiza la reacción de procesamiento completo en ausencia de las proteínas de *Tetrahymena*. No obstante, se sabe que algunas proteínas pueden tener alguna función en la reacción en ciertos tipos de autoprocesamiento de intrones en la célula.

El autoprocesamiento de intrones difiere del de la mayoría de las enzimas proteicas esencialmente en que los primeros pueden catalizar la reacción una sola vez.

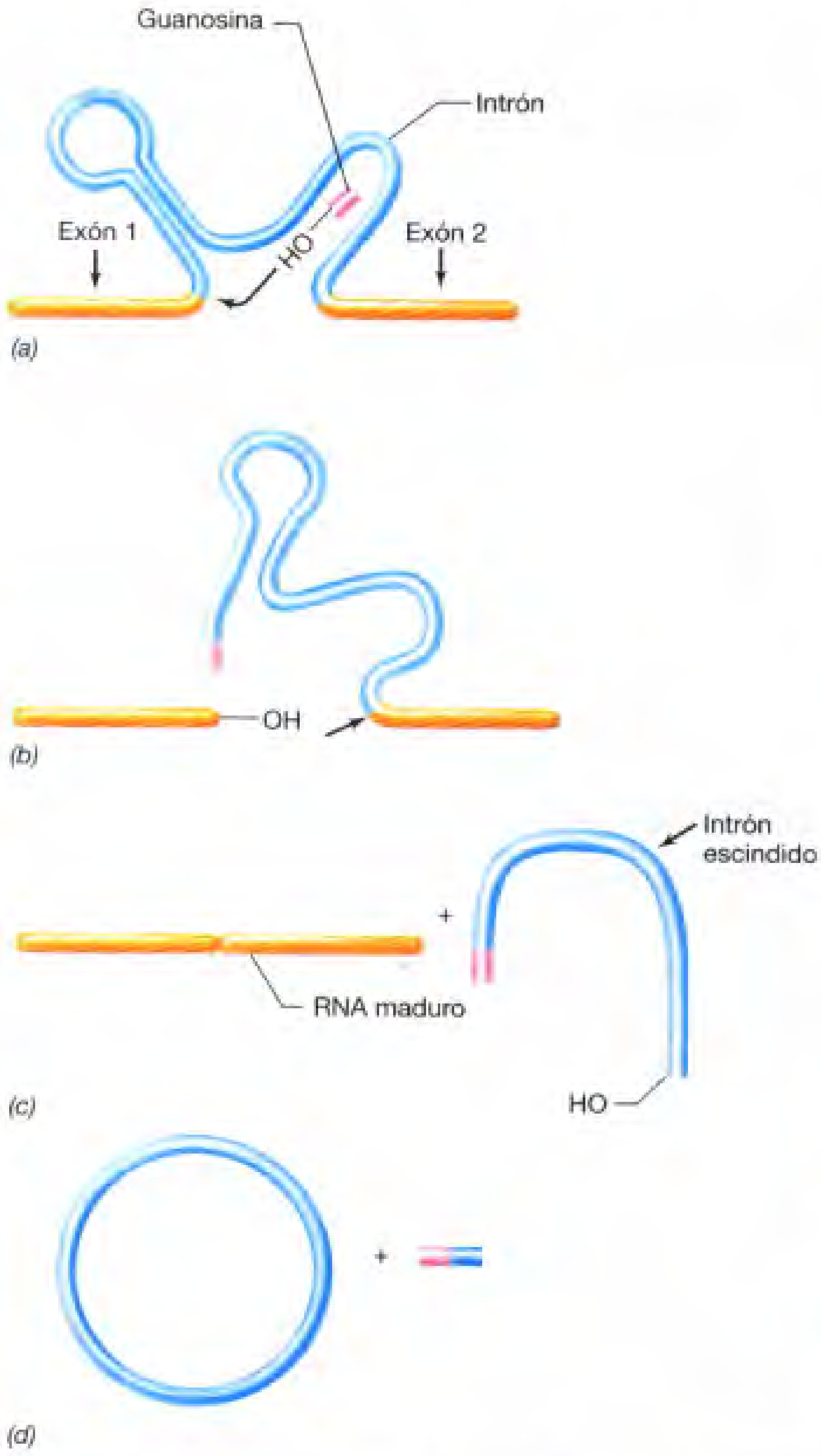


Figura 7.32 Autoprocesamiento del intrón ribozimal del protozoo *Tetrahymena*. La considerable estructura secundaria existente en estas moléculas es crítica para la reacción de corte y empalme. (a) Un precursor de RNA ribosómico contiene un intrón de 413 nucleótidos. (b) Tras la adición del nucleósido guanosina, el intrón se autoprocesa y une los dos exones. (c) El intrón se corta y se elimina. (d) El intrón se circulariza a la vez que pierde un fragmento de 15 nucleótidos.

Sin embargo existe otra ribozima, la RNasa P, que puede actuar repetidamente en muchas moléculas de sustratos diferentes debido a que no se autodigiere durante la reacción. La RNasa P es una ribonucleoproteína, pero el RNA pequeño (377 nucleótidos en *E. coli*) es el componente catalítico y no la proteína. Como en el caso de las proteínas con actividad enzimática, todas las ribozimas deben plegarse en una estructura apropiada para ser activas. En algunos casos, esta estructura puede ser suministrada por la misma estructura secundaria del RNA. En otros, como la RNasa P, las proteínas inactivas pueden ayudar al RNA a adoptar la conformación activa. La RNasa P funciona en la célula para modificar los transcritos primarios de los RNAs de transferencia (*véase* Sección 7.14).

El descubrimiento de las ribozimas ha promovido una evaluación de otros procesos celulares en los que interviene el RNA. Por ejemplo, parece claro que el RNA ribosómico tiene una función en la síntesis de proteínas, incluso catalizando la formación de los enlaces peptídicos que unen los aminoácidos en una proteína (*véase* Sección 7.15); pero, sin duda, la mayoría de las enzimas son proteína. ¿Por qué existen las ribozimas? Se ha propuesto que son vestigios residuales de una forma de vida más simple, «la vida del RNA», que pudiera haber precedido a la era en que las proteínas se convirtieron en los principales catalizadores de la célula. Comentaremos este concepto con más detalle en el Capítulo 11.

✓ 7.12 Revisión de conceptos

Las moléculas de RNA son a menudo modificadas después de la transcripción, una operación denominada procesamiento del RNA. Todos los tRNAs y rRNAs son el resultado del procesamiento de un gran precursor. El procesamiento de los pre-mRNAs es único y puede implicar tres etapas diferentes: corte y empalme (*splicing*), *capping* y adición de poli-A. Los intrones encontrados en otros transcritos se autoprocesan, y el propio RNA cataliza la reacción. Las moléculas de RNA con actividad catalítica se llaman ribozimas y juegan un papel importante en la célula.

- ✓ ¿En qué consiste el *«corte y empalme»*?
- ✓ ¿Qué es una *ribozima*?

V SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

Las dos primeras etapas de la transmisión de la información biológica, *replicación* y *transcripción*, implican la síntesis de ácidos nucleicos utilizando ácidos nucleicos como moldes. La última etapa, la *traducción*, utiliza un ácido nucleico como molde pero en este caso el producto final es una proteína. Las proteínas están hechas de aminoácidos y no de bases, de manera que se puede considerar que la transferencia de la información en la traducción es considerablemente más complicada que el apareamiento de bases. En las secciones siguientes trataremos de la traducción.

7.13 El código genético

Antes de considerar el mecanismo de la traducción, analizaremos la correspondencia entre el ácido nucleico molde y su producto proteico: el **código genético**.

Como mencionamos en la Sección 7.1, un triplete de tres bases llamado **codón** codifica un aminoácido específico. Convencionalmente se presenta el código genético como

TABLA 7.3 El código genético expresado como secuencias de tripletes de mRNA[a]

Codón	Aminoácido	Codón	Aminoácido	Codón	Aminoácido	Codón	Aminoácido
UUU	Fenilalanina	UCU	Serina	UAU	Tirosina	UGU	Cisteína
UUC	Fenilalanina	UCC	Serina	UAC	Tirosina	UGC	Cisteína
UUA	Leucina	UCA	Serina	UAA	Terminación	UGA	Terminación
UUG	Leucina	UCG	Serina	UAG	Terminación	UGG	Triptófano
CUU	Leucina	CCU	Prolina	CAU	Histidina	CGU	Arginina
CUC	Leucina	CCC	Prolina	CAC	Histidina	CGC	Arginina
CUA	Leucina	CCA	Prolina	CAA	Glutamina	CGA	Arginina
CUG	Leucina	CCG	Prolina	CAG	Glutamina	CGG	Arginina
AUU	Isoleucina	ACU	Treonina	AAU	Asparragina	AGU	Serina
AUC	Isoleucina	ACC	Treonina	AAC	Asparragina	AGC	Serina
AUA	Isoleucina	ACA	Treonina	AAA	Lisina	AGA	Arginina
AUG (inicio)[b]	Metionina	ACG	Treonina	AAG	Lisina	AGG	Arginina
GUU	Valina	GCU	Alanina	GAU	Ácido aspártico	GGU	Glicina
GUC	Valina	GCC	Alanina	GAC	Ácido aspártico	GGC	Glicina
GUA	Valina	GCA	Alanina	GAA	Ácido glutámico	GGA	Glicina
GUG	Valina	GCG	Alanina	GAG	Ácido glutámico	GGG	Glicina

[a] Los recuadros de codones están coloreados según el siguiente esquema: 🟨 ionizable; ácido, 🟥 ionizable; básico; 🟩 no ionizable; polar y 🟦 no polar (*véase* Figura 3.12). El nucleótido de la izquierda está en extremo 5′ del triplete.

[b] AUG codifica N-formilmetionina al comienzo de los mRNAs de *Bacteria*.

mRNA y no como DNA, debido a que el proceso de traducción se produce en el RNA. Los 64 codones posibles de mRNA se muestran en la Tabla 7.3. Nótese que además de los codones que codifican los diversos aminoácidos, hay codones especiales para iniciar (AUG) y para finalizar (UAA, UAG, UGA) la traducción.

Quizá la característica más interesante del código genético es que la mayoría de los aminoácidos están codificados por varios tripletes relacionados pero diferentes. Esto significa que en la mayoría de los casos no existe una correspondencia unívoca entre el aminoácido y el codón —conocer el aminoácido no significa conocer automáticamente el codón correspondiente—*. La propiedad de un código en el que no existe relación biunívoca entre la palabra y el código se denomina **degeneración**.

Como veremos (Sección 7.15), en la célula un codón es *leído* por apareamiento de bases con una secuencia de tres bases presente en un tRNA denominada **anticodón**. Si el apareamiento implicado fuera el estándar, A con U y G con C, se esperaría que hubiera al menos un tRNA específico para cada codón y, por tanto, algunos aminoácidos deben tener varios tRNAs. Por ejemplo, en *Escherichia coli* hay 6 tRNA diferentes que llevan el aminoácido leucina. Sin embargo, también es cierto que algunos tRNAs pueden leer más de un codón. Por ejemplo, existe un solo tRNA en *E. coli* que lleva el aminoácido lisina y puede leer AAA o AAG (*véase* Tabla 7.3). Esto es posible porque en algunos casos las moléculas de tRNA forman apareamientos *estándar* en las dos primeras bases del codón, permitiendo apareamientos inusuales en la tercera posición. Este aparente fenómeno erróneo, llamado **flexibilidad** (*wobble*) se ilustra en la Figura 7.33. El apareamiento entre G y U se permite en la tercera posición.

Codones de comienzo y de parada

Como se vio en la Tabla 7.3, unos pocos codones no se corresponden con un aminoácido. Estos tripletes (UAA, UAG, UGA) son los codones **sin sentido** o **de parada**, y señalan la terminación de la traducción del gen que codifica la proteína específica (*véase* Sección 7.15).

¿Cuál es el mecanismo de reconocimiento del *punto de inicio* apropiado? El mensaje se lee comenzando con el **codón de inicio, AUG,** el cual, al comienzo del mensaje, co-

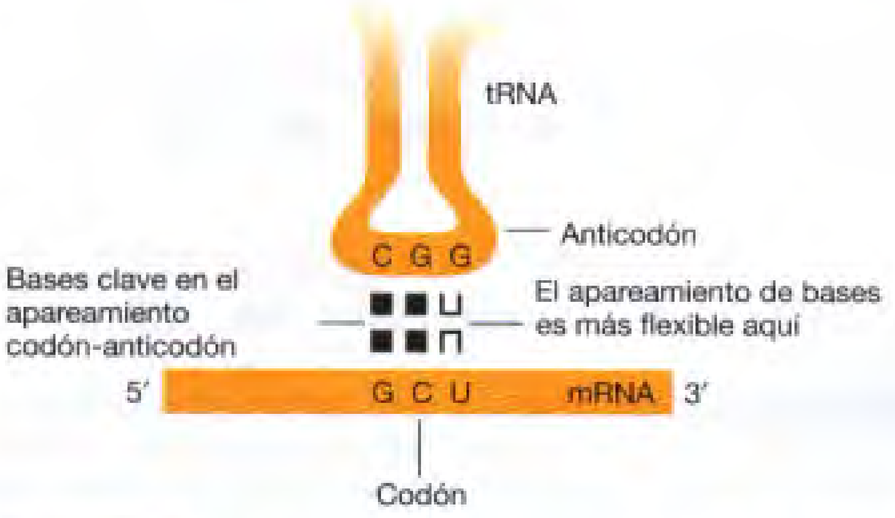

tRNA
Anticodón
C G G
Bases clave en el apareamiento codón-anticodón
U
El apareamiento de bases es más flexible aquí
5′
G C U
mRNA
3′
Codón

Figura 7.33 El concepto de *wobble*: el apareamiento de bases es más flexible para la tercera base del codón. Sólo se muestra una porción del tRNA (*véase* Figura 7.35).

---

* Lo contrario es, sin embargo, verdad. Conociendo el codón en el DNA, uno puede deducir el aminoácido en la proteína (asumiendo que se conoce la fase de lectura correcta). Esto permite la determinación de secuencias de aminoácidos a partir de las secuencias de bases del DNA.

difica el aminoácido N-formilmetionina (o metionina en *Eukarya* y *Archaea*). La importancia de tener un lugar de inicio bien definido se entiende rápidamente si se considera que, con el código de tripletes, es absolutamente esencial para que la traducción comience en el sitio correcto, ya que en caso contrario cambia el **marco de lectura** global y se sintetizará una proteína totalmente diferente (o ninguna proteína). Se ha convenido que la fase abierta «correcta», esto es, la que origina la proteína codificada por el gen, se denomine fase 0 (fase cero). Como podemos ver en la Figura 7.34, las otras dos fases de lectura posibles (−1 y +1) no codifican la misma secuencia de aminoácidos. Así es imperativo que el ribosoma encuentre el *codón de inicio correcto* y, una vez que lo ha hecho, se mueva a lo largo del mRNA en saltos de tres bases exactamente.

Como comentamos en la Sección 7.15, los ribosomas de *Bacteria* reconocen el AUG como un codón de iniciación específico con la ayuda de una secuencia anterior en el mRNA llamada secuencia de Shine-Dalgarno. Esta ayuda extra en la iniciación explica por qué unos pocos mensajes de *Bacteria* utilizan en realidad otros codones, tales como GUG, como codón de inicio. Sin embargo, incluso estos codones de inicio inusuales codifican N-formilmetionina.

Marcos abiertos de lectura

En la actualidad han sido secuenciados los genomas de muchos organismos (incluido el genoma humano). Esta información de secuenciación podría no ser útil a menos que los científicos puedan determinar con facilidad los genes que codifican proteínas. ¿Cómo puede determinarse esto?

Un método común es examinar cada cadena de la secuencia del DNA reconociendo las *fases abiertas de lectura.* Recuérdese que el mRNA se transcribe a partir del DNA; de manera que si se conoce la secuencia del DNA, puede también conocerse la secuencia del RNA que se transcribe del mismo. Si este RNA puede traducirse es porque contiene un marco abierto de lectura (**ORF**, de ***Open Reading Frame***): un codón de inicio (típicamente AUG) seguido de un cierto número de codones para terminar con un codón de parada en fase con el codón de lectura. Una computadora puede programarse para analizar secuencias muy largas en las bases de datos de DNA con el fin de buscar marcos abiertos de lectura. La búsqueda de ORFs es muy útil en genómica (*véase* Capítulo 15) e ingeniería genética (*véase* Capítulo 31) cuando se ha secuenciado un fragmento desconocido de DNA y no está claro si codifica o no una proteína. La búsqueda de ORFs por computadora permite al investigador identificar presuntos genes previamente insospechados.

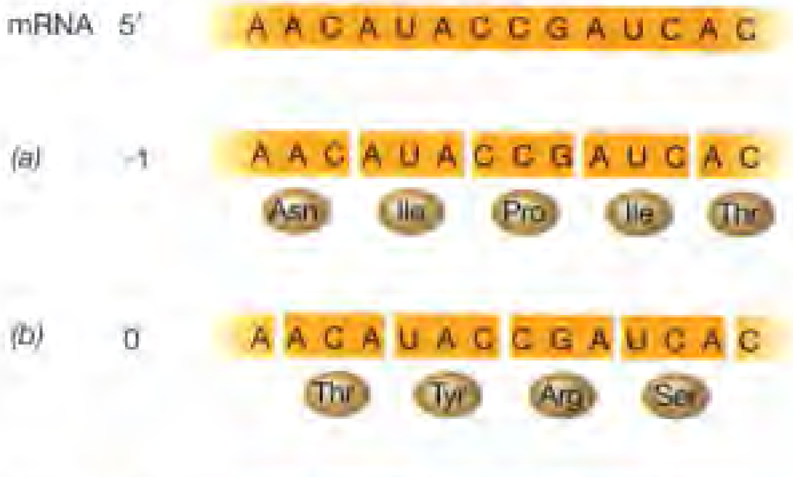

mRNA 5′
A A C A U A C C G A U C A C
(a) −1
A A C A U A C C G A U C A C
Asn
Ile
Pro
Ile
Thr
(b) 0
A A C A U A C C G A U C A C
Thr
Tyr
Arg
Ser
(c) +1
A A C A U A C C G A U C A C
His
Thr
Asp
His

Figura 7.34 Posibles fases de lectura en un mRNA. Se muestra una secuencia interna de un mRNA. La fase «correcta» (ó 0) está determinada por el codón de inicio del mRNA. (a) Aminoácidos que serían codificados por esta región del mRNA si el ribosoma estuviera en la fase de lectura −1. (b) Aminoácidos que serían codificados si el ribosoma estuviera en la fase de lectura correcta. (c) Aminoácidos que serían codificados si el ribosoma estuviera en la fase de lectura +1.

Otros códigos genéticos

Cuando el código genético fue descubierto en los años 60, se vio que era utilizado por todos los procariotas y eucariotas analizados. Cuando el mRNA de la hemoglobina de mamíferos se adicionó a un sistema de síntesis de proteínas procedente de *Escherichia coli* (tal como ribosomas y tRNA), se sintetizó la hemoglobina de mamíferos. Así, el código genético pareció ser un **código universal** ya que el mismo código era utilizado por todos los seres vivos. Esta perspectiva cambió a medida que se obtuvieron genes y proteínas de un gran número de fuentes. Se observó que algunos orgánulos y algunas células usan códigos genéticos que son ligeramente diferentes del código genético universal. (*Véase* cuadro, Selenocisteína: el aminoácido vigésimo primero.)

Estos códigos alternativos se descubrieron inicialmente en los genomas de las mitocondrias. Por lo que se sabe, sólo las mitocondrias de las plantas usan el código universal sin cambio alguno. Los otros orgánulos de plantas, los cloroplastos también usan este código estándar. Las mitocondrias del resto de los eucariotas usan códigos con una o unas pocas diferencias ligeras. Nótese que *no* existe un único código mitocondrial, a pesar de algunas particularidades como el uso general de UGA como codón del triptófano en lugar de codón de parada. También está claro que estos códigos alternativos están muy relacionados con el código universal y, casi con seguridad, derivan evolutivamente de éste. Se conocen varias células tanto en *Bacteria*, el género *Mycoplasma*, como en *Eukarya*, el género *Paramecium*, cuyos cromosomas usan códigos ligeramente diferentes. Todos estos códigos genéticos cromosómicos alternativos asignan diferentes variantes a los codones de parada usuales. Estos organismos tienen simplemente menos codones sin sentido porque uno o dos de ellos son leídos como codones con sentido.

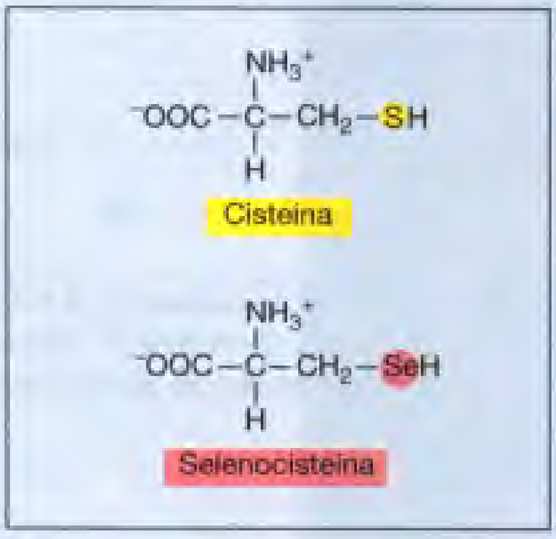
Si cada codón tiene asignado un aminoácido, el lector puede imaginar que es muy difícil cambiar el código genético en un organismo. Por ejemplo el cambio de AUA, que codifica isoleucina, a un codón para metionina significa que cada proteína que tuviera una isoleucina codificada por UAA tendría ahora una metionina en esa posición. Tal proteína podría no ser funcional. El cambio de asignación de codones podría no resultar tan severo si el *uso de codones* no fuera al azar. Cuando los bioquímicos descifraron el có-

Atención a... Selenocisteína: el aminoácido vigésimo primero

El código genético tiene codones para 20 aminoácidos que son ensamblados en proteínas durante la traducción. Sin embargo, muchas proteínas contienen otros aminoácidos. De hecho, existen al menos más de 100 aminoácidos diferentes encontrados en unas pocas proteínas. Hasta hace poco se pensaba que estos aminoácidos «extra» surgían por modificación de uno de los aminoácidos regulares *después* de haber sido incorporados en la proteína, un proceso denominado *modificación postraduccional.* Sin embargo, está claro que uno de estos aminoácidos extra es incorporado a la proteína por la propia maquinaria de traducción. Esta excepción es la *selenocisteína.*

La selenocisteína tiene la misma estructura que la cisteína, pero tiene un átomo de selenio en lugar de un átomo de azufre. Desde hace algún tiempo se sabía que algunas proteínas contenían este aminoácido inusual. Por ejemplo, *Escherichia coli* produce dos enzimas formato deshidrogenasa diferentes y ambas contienen un único residuo de selenocisteína. Cuando se secuenció el gen que codifica una de estas enzimas, se encontró que el codón correspondiente a la selenocisteína era UGA. Normalmente, UGA es un eficaz codón de parada en *E. coli,* pero puede ser traducido directamente como selenocisteína en ciertas moléculas de mRNA, no sólo en *E. coli,* sino también en humanos. Por tanto, la selenocisteína es el vigésimo primer aminoácido codificado por el código genético.

¿Cómo puede un mismo codón funcionar como codón de parada o codón con sentido en el mismo cromosoma? La respuesta se encuentra en el contexto del codón, la secuencia de bases que rodea al codón UGA, y en su estructura secundaria. En ciertos contextos, la maquinaria de traducción interpreta UGA como selenocisteína. En el resto, UGA significa parada de traducción. La selenocisteína tiene su propio tRNA (al igual que un aminoácido regular) y también tiene un factor proteico especial que conduce este tRNA al ribosoma.



$$^{-}OOC-\underset{H}{\overset{NH_3^+}{C}}-CH_2-SH$$

Cisteína

$$^{-}OOC-\underset{H}{\overset{NH_3^+}{C}}-CH_2-SeH$$

Selenocisteína

La selenocisteína es oxidada incluso más rápidamente que la cisteína. Así, las enzimas que contienen este aminoácido deben ser protegidas del oxígeno. Se ha propuesto que UGA pudo haber sido alguna vez un codón con sentido, especificando para selenocisteína exclusivamente, pero que el incremento de la concentración de oxígeno en nuestro ambiente tras la aparición de la fotosíntesis (*véase* Capítulo 11) seleccionó proteínas que contenían cisteína (cuyos codones son UGU y UGC). Esto permitió alterar la asignación del codón UGA excepto en unos pocos casos especiales. ■

digo genético, y antes de que ningún gen hubiese sido secuenciado, se asumió que los codones degenerados de cualquier aminoácido se usarían con igual frecuencia. ¡Ésta es otra de las generalizaciones que la secuenciación del DNA ha demostrado que es incorrecta! El uso de codones está altamente sesgado, y este sesgo varía de unos organismos a otros. En *Escherichia coli,* por ejemplo, sólo una de cada 20 leucinas está codificada por AUA, estando las otras 19 codificadas por AUU y AUC. Se cree que una de las etapas que podría haber conducido al cambio en la asignación de codones sería que un codón llegara a ser utilizado muy raramente en un genoma. Esto habría ocurrido más fácilmente en las mitocondrias, dado que tienen genomas muy pequeños (*véase* Sección, 15.7).

✓ 7.13 Revisión de conceptos

El código genético se expresa en términos de RNA y un único aminoácido puede ser codificado por varios codones diferentes, aunque relacionados. Además de los codones de parada existe un codón específico de inicio que señala dónde debe comenzar la traducción.

- ✓ ¿Por qué es importante que el ribosoma lea «en fase»?
- ✓ Describa una *fase abierta de lectura.*

7.14 RNA de transferencia

Recordemos (Sección 7.13) que el anticodón «lee» (se aparea con) el codón presente en el tRNA. Sin embargo, un tRNA es mucho más que un simple anticodón (Figura 7.35). El tRNA no sólo tiene especificidad por el codón del mRNA, sino que también tiene especifidad por un aminoácido apropiado. El RNA de transferencia y su aminoácido específico son enlazados por enzimas específicas que aseguran que cada tRNA particular recibe su aminoácido correcto. Estas enzimas, denominadas **enzimas activadoras de aminoácidos** o **aminoacil-tRNA sintetasas**, tienen la importante propiedad de reconocer a *ambos,* al aminoácido *y* al tRNA específico para ese aminoácido.

Estructura del tRNA

Existen unos 60 tRNAs específicos diferentes en las células bacterianas y 100-110 en las de mamíferos. Las moléculas de RNA de transferencia son cortas moléculas monocatenarias con longitudes de 73-93 nucleótidos (según los tRNAs). Cuando se comparan, se observa que ciertas bases y estructuras secundarias son constantes para todos los tRNAs, mientras que otras regiones son variables. Las moléculas de tRNA también contienen algunas bases de purina y pirimidina que difieren ligeramente de las bases

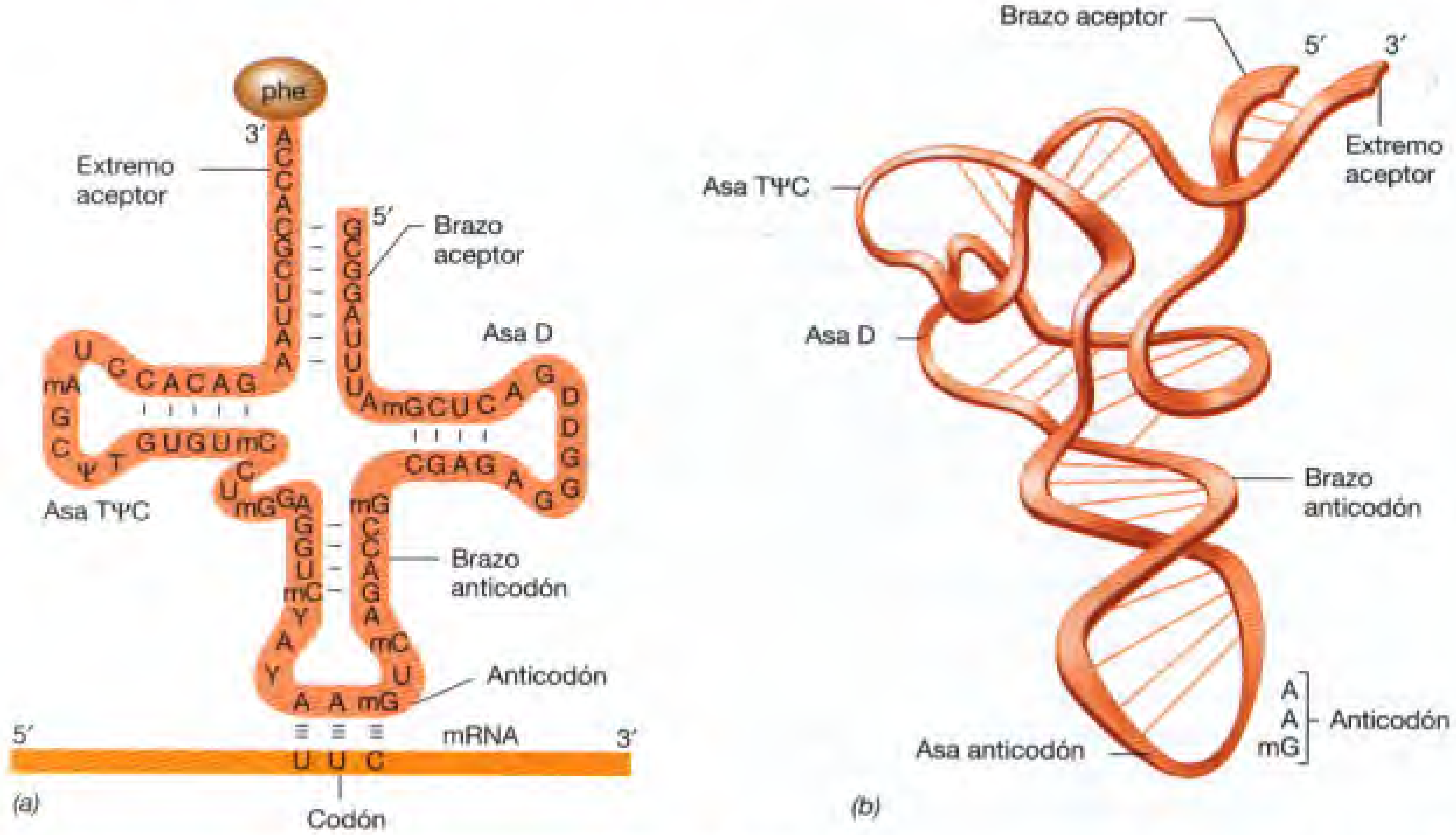


Figura 7.35 Estructura del RNA de transferencia (Fenilalanil tRNA de levaduras). (a) Estructura convencional en hoja de trébol. El aminoácido se une a la ribosa de la A terminal del extremo aceptor. A, adenina; C, citosina; U, uracilo; G, guanina; ψpseudouracilo; D, dihidrouracilo; m, metil; Y, una purina modificada. (b) En realidad, la molécula se pliega de manera que los bucles D y TψC queden muy próximos y se asocien por interacciones hidrofóbicas.

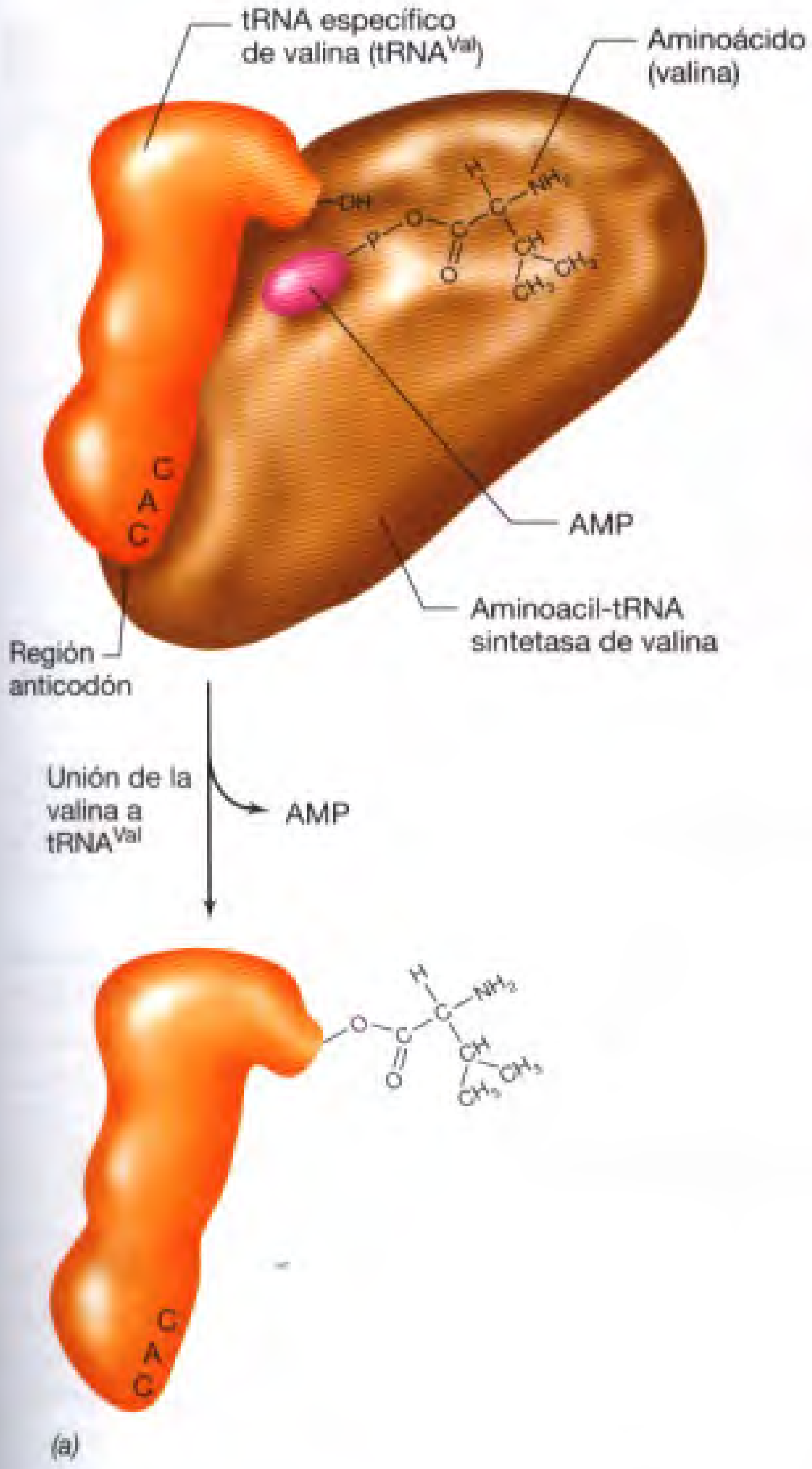
normales presentes en el RNA por haber sido modificadas químicamente, a menudo metiladas. Estas modificaciones de las bases se producen después de la transcripción. Algunas de estas bases inusuales son la pseudouridina, la inosina, dihidrouridina, ribotimidina, metil guanosina, dimetil guanosina y metil inosina. Estas modificaciones de las bases, así como otros tipos de procesamiento (*véase* Sección 7.12), son necesarias para conseguir un tRNA funcional a partir del transcrito de un gen que codifica un tRNA. Aunque el tRNA es una cadena sencilla, dentro de la molécula existen extensas regiones de doble cadena como resultado del apareamiento de bases internas cuando la molécula se pliega sobre sí misma.

La estructura del tRNA puede dibujarse como una hoja de trébol (Figura 7.35*a*). Algunas regiones de la estructura secundaria reciben nombres relacionados con las bases que contienen (el bucle T Ψ C y el bucle D) o con funciones específicas (bucle anticodón y extremo aceptor). La estructura tridimensional de un tRNA se muestra más claramente en la Figura 7.35*b*. Nótese que las bases que aparecen separadas en el modelo de la hoja de trébol están realmente muy juntas cuando se ven en tres dimensiones. Esto significa que algunas de las bases de los «bucles» en realidad están apareadas con bases de otros bucles.

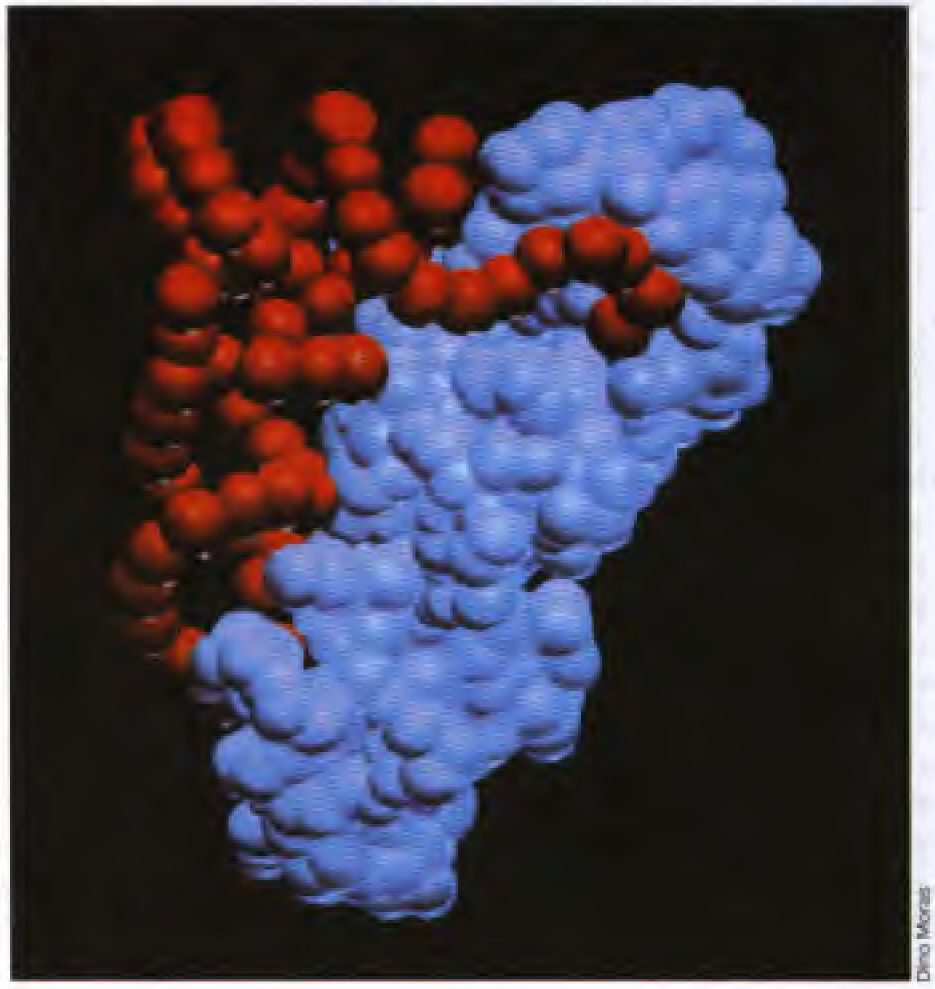
Una de las regiones variables de la molécula de RNA contiene el **anticodón**, el sitio que reconoce el codón en la molécula de mRNA. El anticodón se encuentra en el *bucle anticodón* (Figura 7.35). En el anticodón hay *tres* nucleótidos implicados en el proceso de reconocimiento y que se aparean con el codón (*véase* Sección 7.13). Otras regiones del tRNA interaccionan con el ribosoma (tanto con su rRNA como con sus proteínas), otros factores proteicos, y la enzima activadora. En el extremo 3′, o **extremo aceptor**, de todos los tRNAs, existen tres bases no apareadas. La secuencia de estos tres nucleótidos es siempre citosina-citosina-adenina (CCA), y es el lugar donde la ribosa de la A terminal se une covalentemente al aminoácido mediante un enlace éster. Desde esta posición, el aminoácido se transfiere a la cadena polipeptídica naciente en el ribosoma por un mecanismo que describiremos en la siguiente sección.

Reconocimiento, activación y carga del tRNA

El reconocimiento del tRNA correcto por una aminoacil-tRNA sintetasa implica contactos específicos entre regiones clave del ácido nucleico y aminoácidos particulares de la respectiva sintetasa (Figura 7.36). Como podría esperarse de su secuencia particular, el *anticodón* del tRNA es importante para el reconocimiento por la sintetasa. Sin embargo, otros sitios de contacto son también importantes para el reconocimiento. Estudios de unión del tRNA a las aminoacil-tRNA sintetasas, en los que mediante mutación genética se han cambiado bases específicas del tRNA, han indicado que sólo un pequeño número de nucleótidos importantes están implicados en el reconocimiento; estos otros nucleótidos importantes forman frecuentemente parte del extremo aceptor de la molécu-


tRNA específico de valina (tRNA^{Val})
Aminoácido (valina)
OH
P
O
C
O
C
H
NH$_2$
CH
CH$_3$
CH$_3$
C
A
C
AMP
Aminoacil-tRNA sintetasa de valina
Región anticodón
Unión de la valina a tRNA^{Val}
AMP
O
C
O
C
H
NH$_2$
CH
CH$_3$
CH$_3$
C
A
C

(a)



(b)

Figura 7.36 Aminoacil-tRNA sintetasas. (a) Acción de una aminoacil tRNA sintetasa. Reconocimiento del tRNA correcto por una sintetasa particular implica contactos entre secuencias específicas del ácido nucleico y aminoácidos específicos de la sintetasa. En este diagrama, se muestra la valil-tRNA sintetasa catalizando la etapa final de una reacción, donde la valina, en forma de valil-AMP, se transfiere al tRNA. (b) Modelo computerizado mostrando la interacción de glutaminil-tRNA sintetasa (azul) con su tRNA (rojo). Reproducido con permiso de Science 252:1682-1689 (1991) AAAS.

la de tRNA (Figura 7.35). En unos pocos casos, el reconocimiento de un tRNA por su correspondiente sintetasa es totalmente independiente de la región anticodón. Debe resaltarse que la fidelidad del proceso de reconocimiento es crucial, ya que si se uniera un aminoácido equivocado al tRNA, se insertaría en un lugar equivocado del polipéptido, dando lugar a la síntesis de una proteína errónea.

La reacción química específica entre un aminoácido y el tRNA catalizada por la aminoacil-tRNA sintetasa requiere en primer lugar la *activación* del aminoácido por reacción con el ATP:

$$\text{Aminoácido} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{aminoacil-AMP} + \text{P-P}$$

Una vez formado, el intermediario aminoacil-AMP normalmente permanece unido a la enzima hasta colisionar con un tRNA apropiado; entonces, como se muestra en la Figura 7.36*a*, el aminoácido activado se transfiere al tRNA para formar un tRNA *cargado*:

$$\text{Aminoacil-AMP} + \text{tRNA} \rightleftharpoons \text{aminoacil-tRNA} + \text{AMP}$$

El pirofosfato (P-P) formado en la primera reacción se corta por una pirofosfatasa, formando dos moléculas de fosfato inorgánico. Puesto que se utiliza ATP y se forma AMP, se requiere un total de *dos* enlaces fosfato de alta energía para la activación de un aminoácido y su unión al tRNA. Una vez que ha tenido lugar la activación y carga, el aminoacil-tRNA (AA-tRNA) deja la sintetasa y es conducido al ribosoma por un factor proteico. El mecanismo de síntesis de proteínas se trata en la siguiente sección.

✓ 7.14 Revisión de conceptos

Existen uno o más RNAs de transferencia por cada aminoácido encontrado en las proteínas. Unas enzimas, llamadas aminoacil-tRNA sintetasas, funcionan para unir un aminoácido a un tRNA. Una vez que el aminoácido correcto se une a su tRNA, la especificidad posterior reside exclusivamente en la interacción codón-anticodón.

- ✓ ¿Cuál es la función del *anticodón* de un tRNA?
- ✓ ¿Cuál es la función del *extremo aceptor* de un tRNA?

7.15 Traducción: el proceso de la síntesis de proteínas

La *secuencia* de aminoácidos de una proteína es lo que determina su estructura final (y en último lugar su función). Así, resulta crítico que se inserte el aminoácido apropiado en el lugar idóneo de la cadena polipeptídica. Éste es el papel de la maquinaria que sintetiza proteínas en la célula.

Etapas de la síntesis de proteínas

Los ribosomas son el lugar de síntesis de proteínas. Cada ribosoma está formado por dos subunidades. En procariotas, las unidades del ribosoma son 30S (unidades Svedberg) y 50S, y forman un ribosoma 70S*. Cada subunidad es un complejo ribonucleoproteico compuesto de RNA ribosómico y proteínas ribosómicas específicas. La subunidad 30S está formada por rRNA 16S y unas 21 proteínas, mientras la subunidad 50S contiene rRNA 5S y 23S y unas 34 proteínas (Tabla 7.4 y Figura 7.37*a*). En *Escherichia coli*, existen al menos 53 proteínas ribosómicas diferentes, la mayoría presentes un una sola copia por ribosoma.

Puesto que el genoma de *E. coli* se ha secuenciado completamente y el ribosoma se ha estudiado desde hace tiempo, podría pensarse que deberíamos conocer exactamente el número de proteínas ribosómicas de cada subunidad. Sin embargo, algunas proteínas están fuertemente asociadas al ribosoma, otras algo menos, algunas están asociadas sólo con una subunidad, otras con las dos. Además, el ribosoma es una estructura dinámica que interactúa con muchas otras proteínas de la célula. Existen factores proteicos absolutamente necesarios para que los ribosomas funcionen y que interaccionan con el ribosoma pero no se consideran «proteínas ribosómicas».

La síntesis de una proteína implica un ciclo completo en el cual los varios componentes ribosómicos tienen funciones específicas. Aunque es un proceso continuo, la síntesis de proteínas puede dividirse en una serie de etapas discretas: **iniciación**, **elongación** y **terminación-liberación**. Las dos primeras etapas se esquematizan en la Figura 7.37*b*. Además de mRNA, tRNA y ribosomas, el proceso necesita

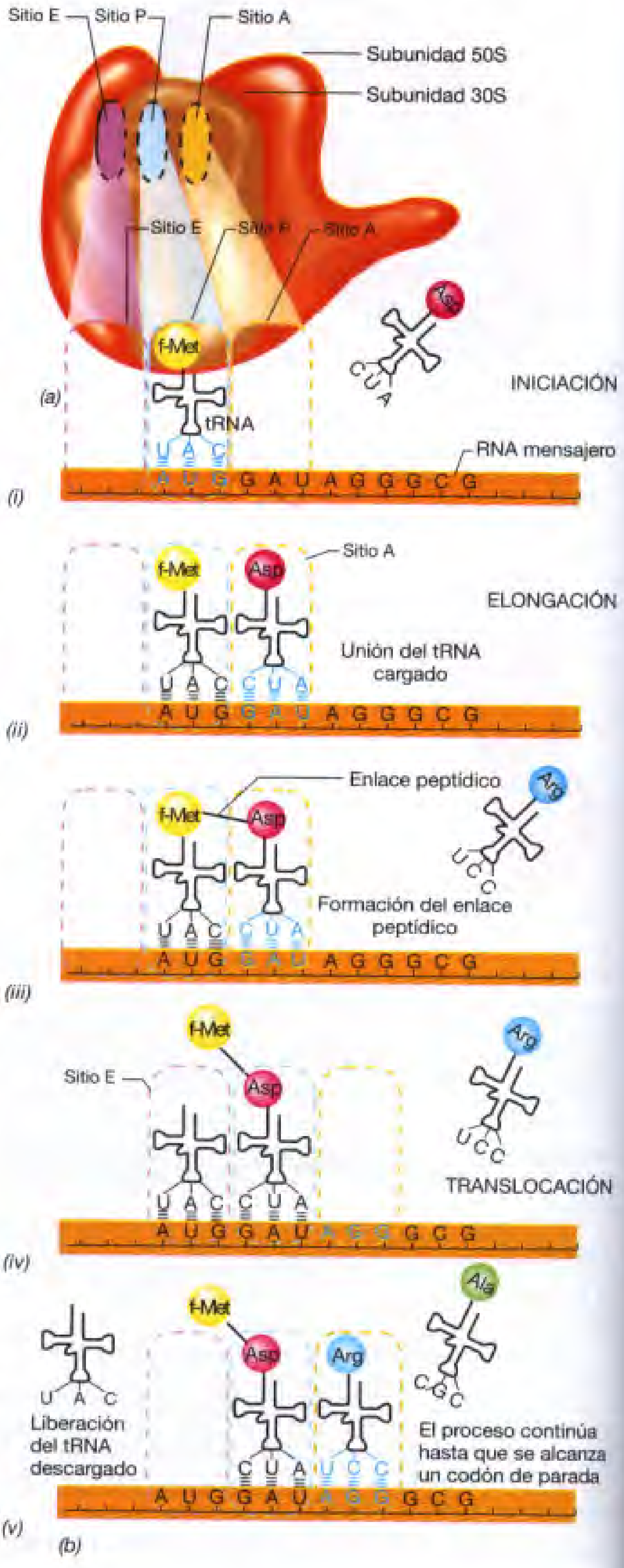

Sitio E
Sitio P
Sitio A
Subunidad 50S
Subunidad 30S
Sitio E
Sitio P
Sitio A
f-Met
Asp
(a)
tRNA
U A C
C U A
INICIACIÓN
RNA mensajero
A U G G A U A G G G C G
(i)
Sitio A
f-Met
Asp
ELONGACIÓN
Unión del tRNA cargado
U A C C U A
A U G G A U A G G G C G
(ii)
Enlace peptídico
f-Met
Asp
Arg
U C C
Formación del enlace peptídico
U A C C U A
A U G G A U A G G G C G
(iii)
f-Met
Asp
Arg
Sitio E
U C C
TRANSLOCACIÓN
U A C C U A
A U G G A U A G G G C G
(iv)
f-Met
Asp
Arg
Ala
U A C
Liberación del tRNA descargado
C G C
El proceso continúa hasta que se alcanza un codón de parada
C U A U C C
A U G G A U A G G G C G
(v)
(b)

Figura 7.37 (a) Estructura del ribosoma, mostrando la posición del sitio A o aceptor a). El sitio P o peptídico y el sitio E o de salida (exit) (b) Traducción de la información del RNA mensajero en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sólo se muestran los sitios en el ribosoma. (i, ii) La interacción entre el codón y el anticodón sitúa en la posición al tRNA correcto, en este caso el tRNA iniciador y después el tRNA del segundo aminoácido. (iii) La formación de un enlace peptídico entre los aminoácidos en moléculas adyacentes de tRNA (iv) La translocación del ribosoma de un codón al siguiente con liberación de tRNA, ahora libre de un aminoácido del sitio E. (v) El siguiente tRNA cargado se une al sitio A.

---

* Los números 30S, 50S y 70S se refieren a unidades Svedberg, que son unidades de los coeficientes de sedimentación de las subunidades ribosómicas o ribosomas intactos cuando se someten a la fuerza centrífuga en una ultracentrífuga.

TABLA 7.4 Estructura del ribosoma[a]

Propiedad	Procariota	Eucariota
Tamaño global	70S	80S
Subunidad pequeña	30S	40S
Número de proteínas	~21	~30
Tamaño del RNA (número de bases)	16S (1500)	18S (2300)
Subunidad grande	50S	60S
Número de proteínas	~34	~50
Tamaño del RNA (número de bases)	23S (2900) 5S (120)	28S (4200) 5,8S (160) 5S (120)

[a] Los ribosomas de las mitocondrias y cloroplastos de eucariotas son similares a los ribosomas procarióticos (*véase* Sección 14.4).

de una serie de proteínas denominadas factores de iniciación, elongación y terminación; la guanosina trifosfato proporciona energía para el proceso.

Iniciación de la síntesis de proteínas

En procariotas, la iniciación comienza siempre con una subunidad ribosómica 30S libre y un **complejo de iniciación** compuesto por una subunidad ribosómica 30S, mRNA, formilmetionina tRNA, y factores de iniciación. Para esta etapa se requiere guanosina trifosfato. A este complejo de iniciación se le une una subunidad 50S para formar un ribosoma 70S activo. Al final del proceso de traducción, el ribosoma liberado se divide de nuevo en subunidades 30S y 50S. Inmediatamente anterior al codón de iniciación existe una secuencia de 3 a 9 nucleótidos (llamada secuencia de **Shine-Dalgarno**) involucrada en la unión del mRNA al ribosoma. El *sitio de unión del ribosoma* presente en el extremo 5′ del mRNA es complementario el extremo 3′ del RNA 16S del ribosoma, y este apareamiento de bases es lo que asegura la formación efectiva del complejo ribosoma-mRNA.

La presencia del sitio Shine-Dalgarno en el mRNA y su interacción específica con el rRNA 16S permite al ribosoma procariótico usar mRNA *policistrónico*, ya que el ribosoma puede encontrar cada lugar de iniciación dentro de un mensaje (*véase* Sección 7.11). Los ribosomas eucarióticos reconocen típicamente un mRNA por el «cap» de su extremo 5′ e inician exclusivamente en el primer codón de iniciación posible. Por tanto, normalmente no pueden traducir mRNA policistrónico.

La iniciación comienza siempre con la unión de un aminoacil-tRNA iniciador especial al **codón de inicio** AUG. En *Bacteria* este tRNA lleva **formilmetionina**. Posteriormente, el grupo formilo del extremo amino terminal del polipéptido se elimina; por tanto, el aminoácido terminal de la proteína completa es metionina. Dado que las secuencias de Shine-Dalgarno (y otras posibles interacciones entre el rRNA y el mRNA) están implicadas en dirigir al ribosoma al lugar de inicio, los mensajes procarióticos utilizan a veces un codón de comienzo diferente a AUG. El codón alternativo más frecuente es el GUG. Cuando se usa de esta manera inusual, GUG une tRNA iniciador con formilmetionina (en lugar de valina). En *Eukarya* y *Archaea*, la iniciación comienza con metionina en lugar de formilmetionina. (Aunque todas las proteínas *se inician* con metionina, este aminoácido es eliminado por una proteasa específica al terminar la traducción.)

Elongación y terminación

El contacto principal entre el mRNA y el ribosoma se establece primariamente a través de la subunidad 30S. El ribosoma contiene otros sitios en los que interactúa el tRNA. Dos de estos sitios están localizados primariamente en la subunidad 50S, y son denominados sitio P y sitio A (Figura 7.37*b*). El sitio A, o sitio aceptor, es el lugar donde se une el nuevo AA-tRNA. El sitio P, el **sitio peptidílico**, es el lugar donde está anclado el péptido naciente mediante un tRNA. Durante la formación del enlace peptídico, el péptido se transfiere al tRNA del sitio A a la vez que se forma un nuevo enlace peptídico. Durante la elongación se requieren varios factores para la **elongación** (no ribosómicos), así como moléculas adicionales de GTP (a efectos de simplificación, en la Figura 7.37*b* se han omitido los factores de elongación y sólo se muestra una porción del ribosoma). El tRNA que mantiene al polipéptido debe ser ahora translocado desde el sitio A al sitio P, dejando así libre el sitio A para recibir otro AA-tRNA.

La translocación requiere un factor de elongación específico y una molécula de GTP por cada tRNA translocado. En cada etapa de translocación el mensaje avanza tres nucleótidos, exponiendo un nuevo codón al sitio A del ribosoma. La translocación empuja el tRNA que ha quedado vacío a un tercer sitio, llamado sitio E. Desde este lugar de **salida**, el tRNA es liberado del ribosoma. La precisión de la etapa de translocación es crítica para la precisión de la síntesis proteica. El ribosoma debe moverse exactamente un codón en cada etapa. El ribosoma es una estructura dinámica: tanto el mRNA como el tRNA se mueven a través del ribosoma a medida que tienen lugar las varias etapas de la síntesis de proteínas. Así, los tres sitios que hemos descrito no son simplemente localizaciones estáticas de la superficie sino *partes en movimiento* de una compleja maquinaria de moléculas biológicas.

Cuando varios ribosomas están traduciendo simultáneamente un mensaje, el complejo se denomina **polisoma** (Figura 7.38). Los polisomas incrementan la velocidad y la eficacia de la traducción, y dado que cada ribosoma actúa independientemente de los otros, cada ribosoma del polisoma produce un polipéptido completo. En la Figura 7.38, podemos observar que los ribosomas más cercanos al extremo 5′ (el comienzo) del mRNA tienen unidos polipéptidos cortos ya que sólo se han leído unos pocos codones, mientras que los ribosomas cercanos al extremo 3′ tienen polipéptidos casi terminados.

La **terminación** de la síntesis de proteínas ocurre cuando se llega a un codón que no especifica para ningún AA-tRNA: un **codón de parada** (*véase* Sección 7.13). Ningún tRNA se une a un codón de parada; en su lugar, unas proteínas llamadas *factores de liberación* leen la señal terminadora de la cadena y cortan el polipéptido unido separándolo del tRNA terminal, liberando así la proteína completa. A continuación, el ribosoma se disocia, y las

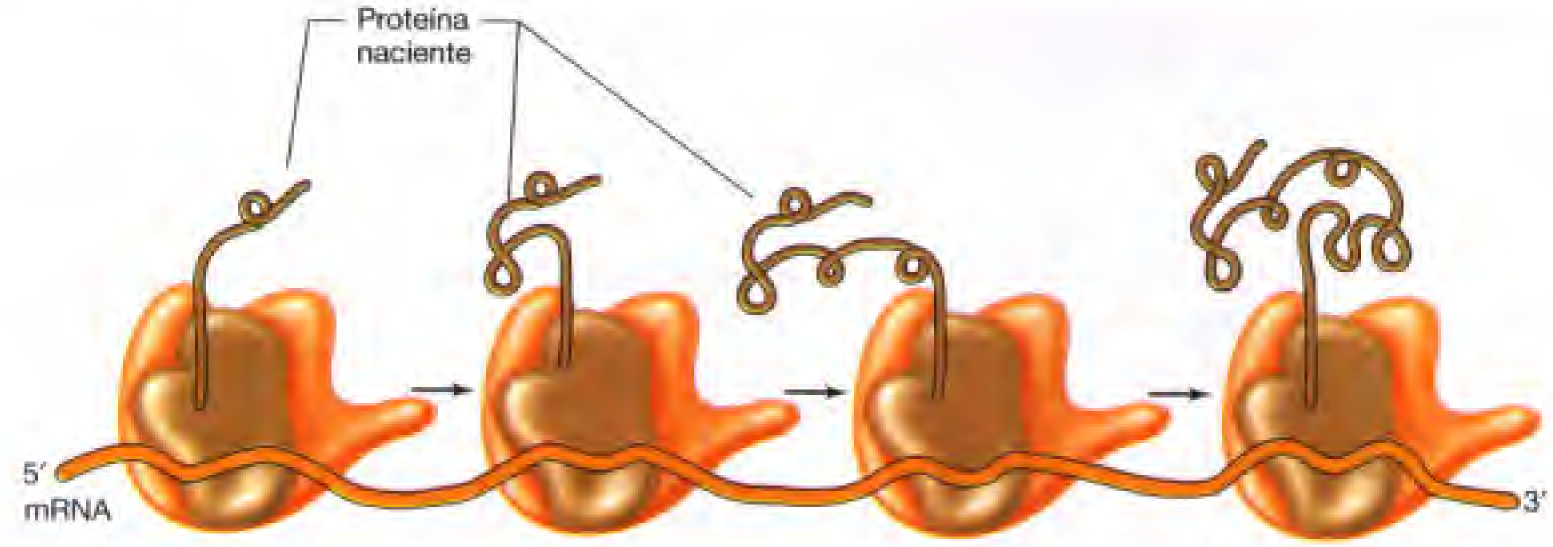


Figura 7.38 Traducción de un único RNA mensajero por varios ribosomas (polisoma). Nótese cómo el ribosoma más cercano al extremo 5′ del mensaje está en un estadio más temprano del proceso.

proteínas quedan libres para formar nuevos complejos de iniciación.

Papel del RNA ribosómico en la síntesis de proteínas

Los ribosomas están compuestos de una serie de proteínas y RNAs ribosómicos (*véase* Tabla 7.4). Hace dos décadas se asumía que las proteínas ribosómicas eran probablemente los componentes funcionales del ribosoma, mientras que la función del RNA era principalmente estructural, es decir, servía de soporte a las proteínas ribosómicas. En la actualidad, está claro que el rRNA tiene una *función* crítica en todas las etapas de la síntesis de proteínas, desde la iniciación a la terminación. Aunque no está claro, el papel de muchas proteínas presentes en el ribosoma puede ser el de facilitar la función del RNA estabilizando o posicionando las secuencias funcionales clave presentes en los RNAs ribosómicos.

En procariotas, parece claro que el RNA 16S está implicado en la iniciación mediante el apareamiento de bases con la secuencia de unión al ribosoma (la secuencia Shine-Dalgarno). Existe evidencia sustancial de que el mRNA y el rRNA interaccionan también durante la elongación.

De igual manera, existe evidencia de que el rRNA participa en la asociación de subunidades, así como en el emplazamiento del tRNA en los sitios decodificadores (A o P, *véase* Figura 7.37*b*) e incluso en la catálisis de la formación del enlace peptídico. Los tRNAs cargados que entran en el ribosoma reconocen el codón correcto por apareamiento de bases codón-anticodón, pero también están físicamente unidos al ribosoma a través de interacciones del extremo del anticodón del tRNA con regiones específicas del rRNA 16S. El extremo aceptor del tRNA interacciona con el rRNA 23S.

La reacción de la peptidil transferasa (la formación real del enlace peptídico que ocurre en la subunidad 50S del ribosoma) está asociada con el rRNA 23S. Durante mucho tiempo se creyó que esta reacción podía ser catalizada por una cierta combinación de proteínas. Sin embargo, parece claro que la reacción es catalizada por la actividad ribozimática del propio rRNA (*véase* Sección 7.12). El rRNA 23S también parece tener una función en la translocación, y se sabe que los factores de elongación interaccionan con el rRNA 23S. Finalmente, el rRNA 16S participa también en la terminación, posiblemente interaccionando con el mRNA o mediante interacciones con los factores de liberación de la proteína.

El RNA ribosómico tiene una función esencial en la traducción. La función ribosómica depende claramente de las principales especies de RNA que están presentes.

Efecto de los antibióticos en la síntesis de proteínas

Un gran número de antibióticos inhibe la síntesis de proteínas mediante su interacción con el ribosoma. Estas interacciones son bastante específicas, y muchas implican rRNA. Varios de estos antibióticos son útiles en medicina, y algunos también son herramientas eficaces en investigación, ya que son específicas de las diferentes etapas de la síntesis de proteínas. Por ejemplo, la *estreptomicina* inhibe la iniciación, mientras la *puromicina*, el *cloranfenicol*, la *cicloheximida* y la *tetraciclina* inhiben la elongación.

Además de su utilidad en clínica, muchos antibióticos inhiben específicamente ribosomas de organismos de uno o dos dominios filogenéticos. De los antibióticos que acabamos de mencionar, el cloranfenicol y la estreptomicina son específicos para los ribosomas de *Bacteria* y la cicloheximida para ribosomas de *Eukarya*. Veremos los antibióticos en el Capítulo 20.

✓ 7.15 Revisión de conceptos

El ribosoma es fundamental en el proceso de traducción, ya que pone en contacto el mRNA y los tRNAs cargados con los aminoácidos. Existen tres sitios en el ribosoma: el sitio aceptor, donde entra el tRNA cargado; el sitio peptídico, donde se encuentra la cadena polipeptídica en formación; y un sitio de salida. Durante cada etapa de la adición de aminoácido, el mensaje avanza tres nucleótidos (un codón) y el tRNA se mueve desde el sitio aceptor al sitio peptídico. La terminación de la síntesis de proteínas ocurre cuando se llega a un codón de parada, que no codifica para ningún aminoácido.

- ✓ ¿Cuáles son los componentes del ribosoma?
- ✓ ¿Qué funciones tiene el rRNA durante la síntesis de proteínas?

7.16 Plegamiento y secreción de proteínas

Acabamos de ver cómo la información presente en la secuencia de bases del DNA se replica, se transcribe a una secuencia de bases en RNA, y se traduce a una secuencia de aminoácidos en la proteína. Sin embargo, nuestro estudio sobre la transmisión de la información biológica no ha terminado. En la Sección 7.1, mencionamos que las proteínas eran las «entidades funcionales» de la célula; por ejemplo, las proteínas enzimáticas catalizan la mayoría de las miles de reacciones que ocurren en la célula. Sin embargo, para que una proteína funcione, debe *plegarse* correctamente y debe estar también en la localización correcta. A continuación, analizaremos brevemente ambos procesos.

Plegamiento de proteínas

Durante mucho tiempo se pensó que todas las proteínas se plegaban espontáneamente en su forma activa a medida que eran sintetizadas (Figura 7.38). Sin embargo, ahora sabemos que no es éste el caso. Muchas proteínas requieren la ayuda de otras proteínas llamadas **chaperones moleculares** para el plegamiento apropiado o para ensamblarse en complejos grandes. Los chaperones no forman parte de las proteínas ensambladas. Una actividad importante de los chaperones es impedir la agregación inapropiada de las proteínas. Existen muchos tipos de estos chaperones e incluso algunos están asociados con los ribosomas. Algunos también son muy abundantes en la célula. Estas proteínas parecen estar ampliamente distribuidas y sus secuencias altamente conservadas.

Un tipo de chaperón molecular, conocido como *chaperoninas*, está presente casi con seguridad en todos los organismos vivos. La actividad de las chaperoninas se muestra en la Figura 7.39. La proteína no-plegada o plegada impropiamente entra en el chaperón molecular en donde se pliega y luego se libera. La energía para el plegamiento proviene del ATP. Otros chaperones moleculares están implicados en conducir la proteína no-plegada hasta la chaperonina. Además de plegar las proteínas recién sintetizadas, los chaperones pueden volver a plegar proteínas que han sido parcialmente desnaturalizadas en la célula. Tal desnaturalización puede producirse si el organismo ha experimentado temporalmente altas temperaturas en su ambiente. La renaturalización no siempre tiene éxito, y las células también poseen proteasas que identifican y destruyen las proteínas mal plegadas.

Secreción de proteínas

Muchas proteínas funcionan en la membrana de las células o incluso *fuera* de las mismas y deben alcanzar estas localizaciones, insertándose en la membrana plasmática o cruzándola, una vez que han sido sintetizadas en los ribosomas. En procariotas, se secretan las enzimas periplásmicas y las enzimas extracelulares y se denominan *proteínas de secreción* (*véase* Sección 4.7). En eucariotas existe un buen número de orgánulos rodeados por membranas, por ejemplo, la mitocondria, a cuyo interior deben transportarse algunas proteínas, mientras que otras proteínas deben secretarse fuera de la célula. Se ha estimado que cerca de la mitad de las proteínas de una célula eucariótica se transportan a la membrana o a través de ésta.

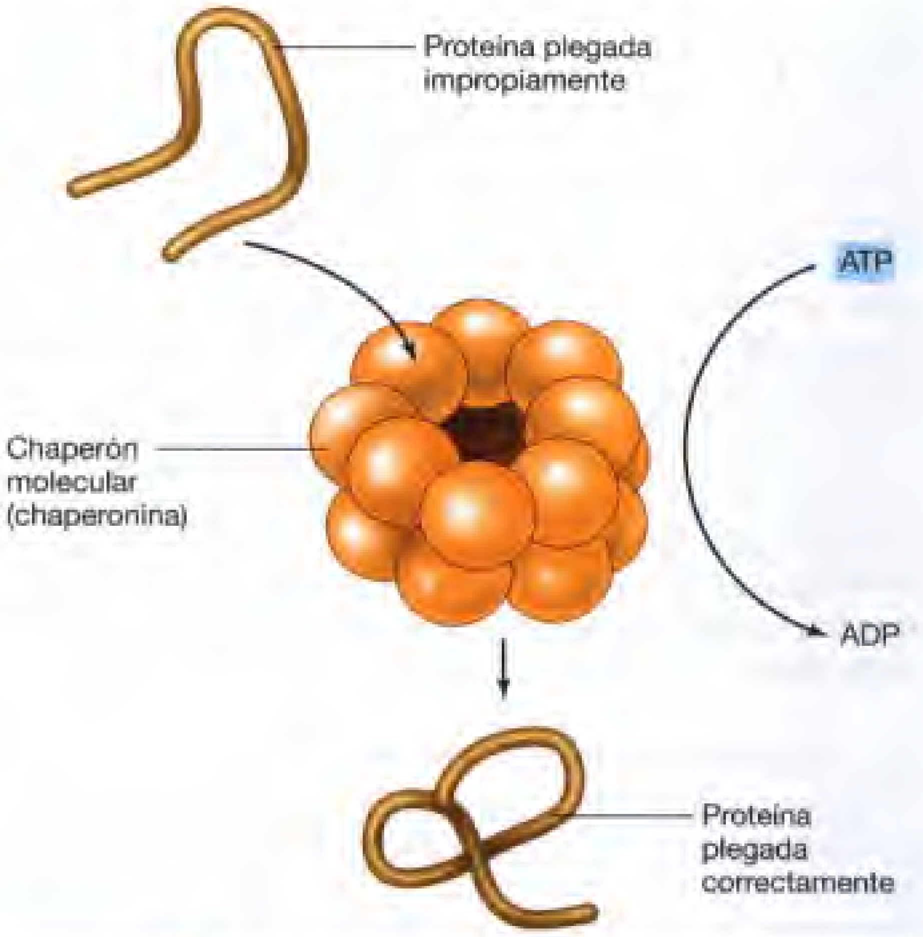

Proteína plegada impropiamente
ATP
Chaperón molecular (chaperonina)
ADP
Proteína plegada correctamente

Figura 7.39 Acción de un chaperón molecular. Una proteína plegada impropiamente se incorpora dentro de la estructura en forma de barril de la chaperonina. Se utiliza la energía del ATP para plegar la proteína adecuadamente.

¿Cómo es posible que la célula transfiera selectivamente proteínas a través de la membrana mientras la mayoría de las mismas las mantiene en el citoplasma? La mayoría de las proteínas que deben ser transportadas a través de las membranas son sintetizadas con una extra-secuencia en el extremo amino terminal, de unos 12-20 aminoácidos, denominada **secuencia señal**. Las secuencias señales son bastante variables pero, en general, poseen unos cuantos residuos cargados positivamente al comienzo, una región central con residuos hidrofóbicos y luego una región más polar. La secuencia señal sirve para que otras proteínas de la célula reconozcan que esta proteína particular está destinada a la exportación y también puede ayudar a impedir el plegamiento completo de la propia proteína. Puesto que la señal es parte de la proteína que se sintetiza primero, las primeras etapas del transporte pueden comenzar antes de que la proteína sea sintetizada completamente. En eucariotas, el transporte está íntimamente ligado a la traducción y la proteína sintetizada no es liberada del ribosoma al citoplasma. Los propios ribosomas están asociados con membranas. Incluso en procariotas, existen chaperones asociados a ribosomas que participan en este proceso.

El principal papel en la selección de proteínas que van a ser secretadas lo ejerce la **partícula que reconoce la señal** (**SRP**, de ***Signal Recognition Particle***). Todas las células poseen SRPs. En *Bacteria*, contienen una única proteína y una molécula de RNA pequeña llamada 4,5S RNA. (Este pequeño RNA no es RNA de transferencia, ribosómico o mensajero. La mayoría de las células contienen pequeñas moléculas de RNA que no pertenencen a ninguna de las clases principales.) La SRP reconoce la secuencia señal y transfiere a la proteína que la lleva a un complejo proteico especial de la membrana (por ejemplo, SecYEG, *véase* Sección 4.7) donde la proteína es secretada mediante un proceso que implica transporte a través de un poro. Durante este proceso, la secuencia señal es cortada usualmente por la peptidasa señal, lo que constituye un ejemplo de **modificación postraduccional.**

El estudio de la secreción de proteínas tiene importantes implicaciones prácticas para la ingeniería genética (*véase* Capítulo 31). Si una bacteria modificada genéticamente va a utilizarse como agente de producción de proteínas heterólogas, es deseable manipular la secuencia señal para que la proteína deseada pueda ser secretada y, de esta manera, obtenida y purificada rápidamente.

✓ 7.16 Revisión de conceptos

Las proteínas deben plegarse adecuadamente para que funcionen correctamente. El plegamiento debe producirse espontáneamente, pero puede también necesitar de otras proteínas denominadas chaperones moleculares. Muchas proteínas necesitan ser transportadas hasta el interior de las membranas celulares o a través de ellas. Tales proteínas son sintetizadas con una secuencia señal que es reconocida por la maquinaria transportadora de las células, secuencia que es eliminada después de ser exportadas.

✓ ¿Qué es un *chaperón molecular*?
✓ ¿Por qué algunas proteínas tienen una *secuencia señal*?
✓ ¿Qué es una *partícula de reconocimiento de la señal*?

En este capítulo hemos visto que la información biológica se transmite del DNA al RNA, y finalmente a proteína. Los mecanismos de las tres etapas de transferencia de información, replicación, transcripción y traducción son bastante similares en procariotas y eucariotas. La información presente en un gen puede ser replicada con precisión, de manera que cuando una célula se divide la progenie tiene la misma información genética. La información del gen puede también transcribirse a un RNA, y, en el caso de los genes que codifican para proteínas, traducirse a proteínas. Aunque algunos RNAs tienen actividad catalítica, son las proteínas los componentes de la célula que llevan a cabo los miles de reacciones que constituyen el metabolismo celular. En breve, prestaremos atención al modo en que las células regulan la expresión de un gen particular o de un conjunto de genes.

Preguntas de repaso

1. Describa el *dogma central* de la biología molecular.
2. Los genes se descubrieron antes de que se determinara su naturaleza química. Defina un gen sin mencionar su naturaleza química. ¿De qué está compuesto un gen?
3. Las repeticiones invertidas pueden originar un bucle con forma de horquilla. Demuéstrelo escribiendo la secuencia de un DNA de doble cadena que contenga una repetición invertida y muestre cómo el transcrito de esta región puede formar un bucle.
4. ¿Se puede decir que la secuencia 5'-GCACGGCACG-3' es una repetición invertida? Razone su respuesta.
5. Las moléculas de DNA ricas en AT se separan en dos cadenas más fácilmente que las ricas en AT cuando se eleva la temperatura. Dé una explicación para esta observación basada en las propiedades de apareamiento de los pares AT y GC.
6. Una estructura que se observa frecuentemente durante la replicación de DNA circular es la llamada *estructura theta*. Dibuje un diagrama del proceso de replicación y muestre cómo puede surgir una estructura theta.
7. ¿Por qué son tan raros los errores en la replicación del DNA? ¿Qué otra actividad enzimática (además de la polimerización) está asociada con la DNA polimerasa III y cómo se utiliza para reducir errores?
8. ¿Qué son las ribozimas y con qué tipos de reacciones bioquímicas están asociadas?
9. Existen tres etapas de procesamiento en la generación de la mayoría de los mRNA eucarióticos pero no procarióticos. Escriba una corta descripción de cada una de estas tres etapas.
10. ¿Qué son las aminoacil-tRNA sintetasas y qué reacciones catalizan? ¿Cuántos tipos diferentes de estas enzimas existen aproximadamente en la célula? ¿Cómo reconoce una sintetasa los sustratos correctos?
11. ¿Tienen promotores los genes del tRNA? ¿Tienen codones de inicio? Explíquelo.
12. Los sitios de inicio y de parada (en el DNA) para la síntesis de mRNA son diferentes de los sitios de inicio y parada (en el mRNA) para la síntesis de proteínas. Explíquelo.
13. La actividad que forma los enlaces peptídicos en el ribosoma se llama *peptidil transferasa*. ¿Qué molécula de la célula cataliza esta reacción?
14. A veces las proteínas mal plegadas pueden ser plegadas correctamente pero a veces no, siendo entonces destruidas. ¿Qué clase de proteínas están implicadas en el plegamiento de proteínas mal plegadas? ¿Qué tipo de enzimas se encargan de destruir las proteínas mal plegadas?

Ejercicios prácticos

1. El genoma de la bacteria *Neisseria gonorrhoeae* consiste en una única molécula de DNA bicatenario de 2220 kilopares de bases. Calcule la longitud de esta molécula en centímetros. Si el 85% de esta molécula de DNA corresponde a genes que codifican proteínas y la longitud media de las proteínas es de 300 aminoácidos, ¿cuántos genes que codifican proteínas posee *Neisseria*? ¿Qué clase de información cree que puede estar presente en el 15% restante del DNA?
2. Las moléculas de DNA circular, como las de la mayoría de los cromosomas bacterianos, evitan un problema existente en la replicación del DNA lineal. ¿Cuál es este problema? Por otra parte, tener un cromosoma circular presenta un nuevo problema: los dos cromosomas hijos se encuentran entrelazados al completarse la replicación. ¿Existe algún tipo de enzima comentada en este capítulo que pudiera ayudar a separar estas dos moléculas de manera que pudieran repartirse entre las dos células hijas?
3. Muchas moléculas de mRNA bacteriano son policistrónicas, codificando cada mRNA más de una proteína. Imagine un mRNA que codifica dos proteínas con una región separadora no codificadora, entre las dos regiones codificadoras. Desde su concepto del proceso de transcripción, explique por qué el resultado final serían dos proteínas separadas más que una proteína mixta (híbrida).
4. ¿Cuál sería el resultado (en términos de síntesis de proteínas) si la RNA polimerasa iniciara la transcripción una base antes del punto normal de inicio? ¿Por qué? ¿Cuál sería el resultado (en términos de síntesis de proteínas) si la traducción comenzara una base después del lugar normal de inicio? ¿Por qué?
5. En la bacteria *Salmonella enterica* la glutamil-fosfato reductasa y la glutamina quinasa, dos de las enzimas implicadas en la síntesis de prolina se transcriben aparentemente de un único mensajero policistrónico. Dibuje un esquema de la región del cromosoma que contenga dos genes que codifiquen estas enzimas. Muestre la(s) posición(es) relativa correcta de la porción de DNA que contiene: promotor(s), secuencia(s) de Shine-Dalgarno, codones de inicio y de parada y terminadores de transcripción. ¿Considera probable que estos genes tengan intrones? ¿Por qué?
6. Si los genes que ha dibujado al responder la Pregunta 5 fueran realmente dos genes que codificaran dos tRNA, ¿qué cambiaría en su diagrama?

La mayoría de los genes contienen la información que codifica una sola proteína. Sin embargo, para que esta proteína se sintetice, el genoma debe expresarse primero. Los organismos regulan la expresión de sus genes de manera que sus proteínas, así como otras moléculas, se sinteticen en la cantidad adecuada y en el momento oportuno del ciclo celular. La regulación de la expresión génica puede estar influenciada por el ambiente en el que se encuentra la célula. Esta regulación implica a menudo interacciones muy precisas entre determinados genes en el DNA y proteínas reguladoras específicas, como se muestra en esta página para la proteína represora del bacteriófago lambda (una proteína reguladora de la transcripción) unida a su DNA. La unión de proteínas al DNA puede ser un mecanismo que «enciende» o que «apaga» la expresión génica.

8

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

I GENERALIDADES DE LA REGULACIÓN 207
8.1 Principales tipos de regulación 207
II REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA 208
8.2 Inhibición de la actividad enzimática 208
8.3 Modificación de enzimas 210
III REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN: CONTROL POSITIVO Y CONTROL NEGATIVO 211
8.4 Proteínas que se unen al DNA 212
8.5 Control negativo de la transcripción: represión e inducción 215
8.6 Control positivo de la transcripción 217
8.7 Control global y el operón *lac* 218
IV REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN: OTROS MECANISMOS 220
8.8 Atenuación 220
8.9 Otras redes de control global 222
8.10 Transducción de señales y sistemas reguladores de dos componentes 224
8.11 Regulación de la quimiotaxis 226
V PUNTUALIZACIONES FINALES SOBRE LA REGULACIÓN 228
8.12 Diferencias en la expresión génica entre procariotas y eucariotas 229

Glosario

Atenuación un mecanismo que controla la expresión génica; la transcripción se termina después de la iniciación pero antes de que se produzca un mRNA completo

Control negativo un mecanismo que regula la expresión génica en el cual una proteína represora funciona previniendo la transcripción de uno o más genes

Control positivo un mecanismo que regula la expresión génica en el que una proteína activadora funciona promoviendo la transcripción de uno o más genes

Enzima alostérica una enzima que contiene dos sitios combinantes, el sitio activo (donde se une el sustrado) y el sitio alostérico (donde se une una molécula efectora)

Inhibición por retroalimentación una disminución en la actividad de la primera enzima de una ruta causada por el producto final de la misma

Operón uno o más genes transcritos en un único RNA bajo el control de un único sitio regulador. Sin embargo, el término se utiliza para describir una unidad de transcripción que contiene más de un gen

Proteína activadora una proteína reguladora que se une a sitios específicos del DNA y activa la transcripción; implicada en el control positivo

Proteína reguladora de la respuesta uno de los dos miembros de un sistema de dos componentes; una proteína reguladora que es fosforilada por una proteína quinasa sensora (*véase* proteína quinasa sensora)

Proteína represora una proteína reguladora que se une a sitios específicos del DNA y bloquea la transcripción; implicada en el control negativo

Proteína quinasa detectora uno de los miembros de un sistema de dos componentes; una quinasa que se encuentra en la membrana celular y que se autofosforila en respuesta a una señal externa y luego pasa el grupo fosforilo a una proteína reguladora de respuesta (*véase* proteína reguladora de la respuesta)

Quinasa una enzima que adiciona un grupo fosfato a un compuesto

Quorum sensing rutas reguladoras de *Bacteria* que responden a densidad de población

Sistema de dos componentes un sistema regulador que contiene una proteína quinasa sensora y una proteína reguladora de la respuesta (*véase* proteína sensora y proteína reguladora de la respuesta)

En un capítulo anterior vimos cómo la información guardada como una secuencia de bases en un gen puede ser transcrita a un RNA, y luego traducida para originar una proteína específica. Muchas proteínas son enzimas (*véase* Sección 5.5) y llevan a cabo las reacciones responsables del metabolismo celular. Cientos de reacciones enzimáticas diferentes ocurren simultáneamente durante un único ciclo de crecimiento celular. Los *micro*organismos también responden rápidamente a cambios en su ambiente; y muchos organismos tienen complicados sistemas de desarrollo. Para orquestar eficazmente las numerosas reacciones químicas de una célula, sacar el máximo provecho a los recursos accesibles y llevar a cabo los procesos del desarrollo, las células necesitan *controlar* la expresión de la información genética.

GENERALIDADES DE LA REGULACIÓN

Algunas enzimas pueden necesitarse en la misma cantidad durante todas las condiciones de crecimiento y se denominan *constitutivas*. Las enzimas constitutivas son generalmente enzimas celulares clave requeridas para el crecimiento bajo todas las condiciones nutricionales y, por tanto, se sintetizan continuamente en la célula en crecimiento. Sin embargo, es mucho más frecuente que una reacción particular sea necesaria en algunas condiciones pero no en otras. Además, bajo un buen número de condiciones de crecimiento, la célula puede no necesitar una reacción particular. Por ejemplo, las enzimas que se requieren para la hidrólisis del azúcar lactosa son útiles a la célula sólo cuando existe lactosa en el medio. La mayoría de los microorganismos tienen genes que codifican muchos más tipos de proteínas diferentes que las que están presentes en la célula en unas condiciones determinadas de crecimiento (*véase* Sección 2.2). Así, la necesidad de regular la expresión génica en respuesta a las condiciones de crecimiento cambiantes, o como parte de un proceso de desarrollo, parece clara. ¿Cómo se produce este tipo de regulación?

8.1 Principales tipos de regulación

En la célula existen dos tipos principales de regulación. Uno controla la *actividad* de las enzimas preexistentes, y otro controla la *cantidad* (e incluso la total presencia o ausencia) de una enzima (Figura 8.1). Obviamente, la regulación de la actividad enzimática ocurre *después* de que la proteína haya sido sintetizada (esto es, postraduccionalmente). Por el contrario, la regulación de la cantidad de enzima sintetizada puede ocurrir en la transcripción (cantidad de RNA mensajero —mRNA— que se sintetiza) o en la traducción (si el RNA se traduce o no para originar la proteína). El control de la regulación de la síntesis de una enzima es un proceso más lento que el control de la regulación de su actividad. La regulación de la actividad es muy rápida (segundos o menos), mientras la regulación de la síntesis de una enzima es un proceso relativamente lento (unos pocos minutos). Si se necesita sintetizar una nueva enzima, el proceso llevará algún tiempo antes de que la enzima esté presente en suficiente cantidad en la célula como para afectar al metabolismo. En cambio, si se detiene la síntesis de una enzima, puede pasar un considerable periodo de tiempo antes de que la enzima se diluya lo suficiente como para dejar de afectar al metabolismo celular. Funcionando conjuntamente, estos mecanismos pueden regular de forma eficaz el metabolismo celular.

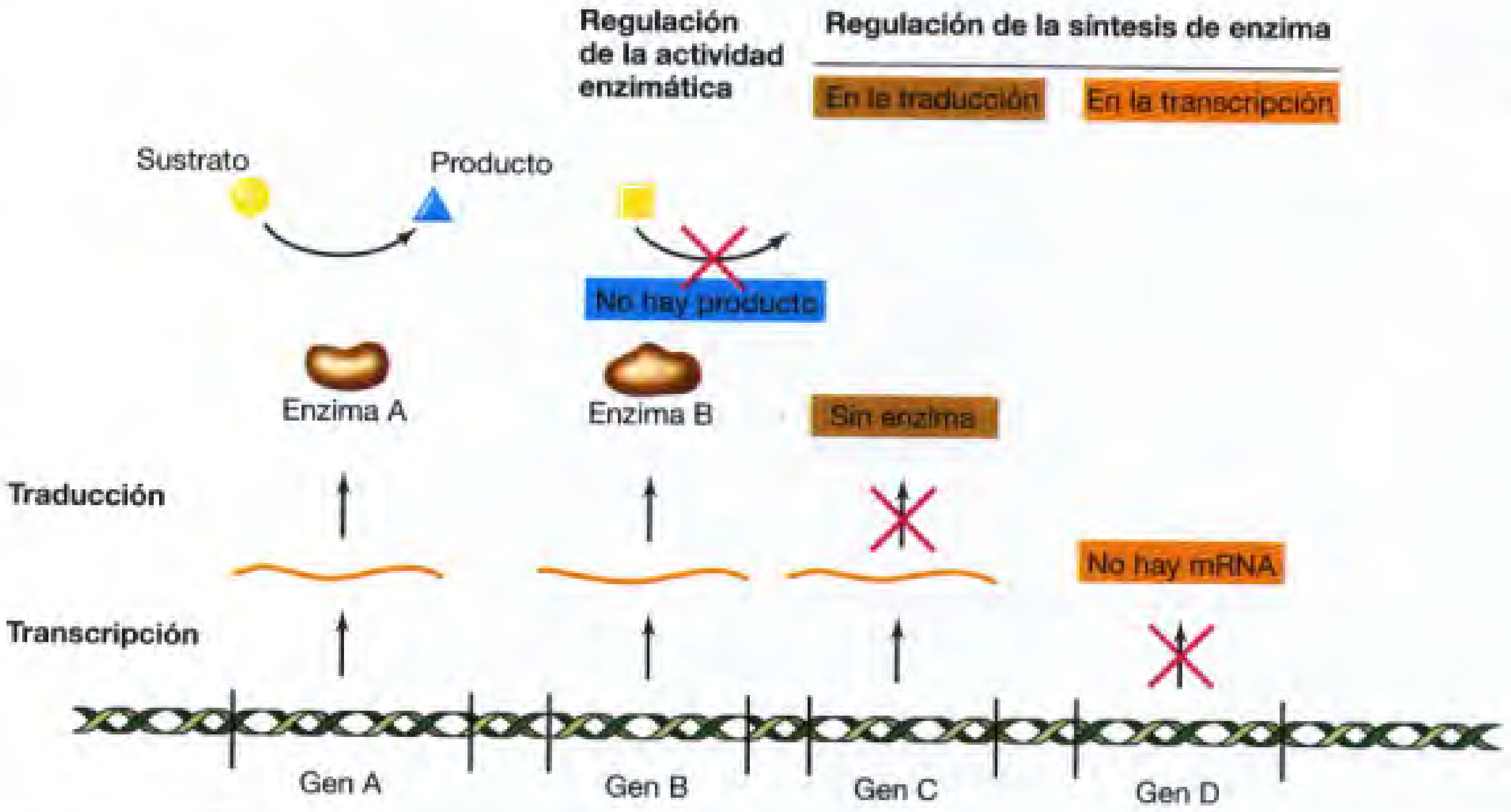


Figura 8.1 Visión general de los mecanismos de regulación. El producto del gen A es la enzima A, que se sintetiza constitutivamente y lleva a cabo su reacción. La enzima B se sintetiza también constitutivamente pero su *actividad* puede ser inhibida. La *síntesis* del producto del gen C puede prevenirse por control a nivel traduccional. La *síntesis* del producto del gen D puede prevenirse a nivel de transcripción.

Los sistemas de control que hacen variar el nivel de *expresión* de genes particulares son el principal tema del presente capítulo. Sin embargo, el número real de mecanismos reguladores diferentes es extenso, y la mayoría de los genes parecen estar regulados por más de uno. Comenzaremos exponiendo brevemente los procesos implicados en la regulación de la *actividad* de enzimas preformadas antes de considerar cómo se controla la síntesis de enzimas.

✓ 8.1 Revisión de conceptos

La mayoría de los genes codifican proteínas y la mayoría de las proteínas son enzimas. La expresión de uno de estos genes puede regularse controlando la actividad de la enzima o controlando la cantidad de la enzima producida.

- ✓ ¿Qué etapas pueden ser objeto de regulación en la síntesis de proteínas?
- ✓ ¿Qué proceso es más rápido, la regulación de la actividad o la regulación de la síntesis?

II REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Existen muchos mecanismos de regulación postraduccional. En algunos casos, la enzima se sintetiza como parte de una proteína precursora inactiva más grande, y la enzima debe ser activada mediante la eliminación de una porción de la proteína precursora (*véase* el cuadro, «Procesamiento de proteínas»). Otro mecanismo es la reducción del nivel de actividad mediante la degradación de las moléculas enzimáticas. En las dos secciones siguientes describiremos las formas de regulación reversibles y temporales que implican cambios menos drásticos de la molécula enzimática.

8.2 Inhibición de la actividad enzimática

Como se ha mencionado, algunas proteínas no tienen actividad enzimática hasta que no son procesadas. Sin embargo, es más habitual que una proteína se sintetice totalmente activa, y que esta actividad se vea luego reducida, o *inhibida*, por ciertos compuestos específicos presentes en la célula. Estos compuestos están generalmente relacionados con la ruta metabólica en la que interviene la enzima.

Un mecanismo importante para el control de la actividad enzimática involucra al fenómeno denominado **inhibición por retroalimentación.** La inhibición por retroalimentación se observa principalmente en la regulación de las rutas biosintéticas completas, tales como las rutas implicadas en las síntesis de un aminoácido o una purina. Como se ha visto, tales rutas requieren muchas etapas enzimáticas y el producto final, aminoácido o nucleótido, está separado del sustrato inicial por muchas etapas (*véase* Sección 5.15). Aun así, este producto final es capaz de retroalimentar la primera etapa de la ruta y regular su propia biosíntesis; ¿cómo?

En la inhibición por retroalimentación, el aminoácido u otro producto final de la ruta biosintética inhibe la actividad de la *primera* enzima de esta ruta. Así, a medida que se incrementa el producto final en la célula, su síntesis se inhibe más y más. Si el producto final se consume, su síntesis se reanuda (Figura 8.2).

¿Cómo es posible que el producto final inhiba la actividad de una enzima que actúa sobre un sustrato bastante diferente de aquél? Esto es debido a una propiedad de la enzima inhibida conocida como **alosterismo**. Una enzima alostérica tiene dos sitios de unión importantes, el sitio *activo*, donde se une el sustrato, y el sitio *alostérico*, donde se une reversiblemente al inhibidor (llamado a veces «efector»). Cuando un inhibidor se une, por lo general no covalentemente, al sitio alostérico, la conformación de la molécula de enzima cambia, de manera que el sustrato deja de unirse eficientemente al sitio activo (Figura 8.3). Cuando disminuye la concentración del inhibidor, el equilibrio favorece la disociación del inhibidor del sitio alostérico, regresando el centro activo a su forma catalítica. Las enzimas alostéricas son muy comunes en las rutas anabólicas y catabólicas, y son especialmente importantes en las rutas ramificadas. Por ejemplo, los aminoácidos prolina y arginina son sintetizados a partir del ácido glutámico. La Figura 8.4 muestra cómo estos dos aminoácidos pueden controlar la primera enzima exclusiva de su propia biosíntesis sin afectar a la otra, de manera que un suministro de prolina, por ejemplo, no provoque la falta de arginina.

Además, algunas rutas biosintéticas son reguladas por el uso de **isoenzimas** (contracción para enzimas isofuncionales: *iso* significa «mismo» o «constante»). Estas enzimas catalizan la misma reacción pero están sujetas a diferente control regulador. Un ejemplo es la síntesis de aminoácidos aromáticos (Figura 8.5; *véase* Figura 5.26). Tres isoenzimas diferentes catalizan la primera reacción en esta ruta, y cada enzima se regula independientemente por cada uno de los tres productos aminoácidos finales. A diferencia de los ejemplos anteriores de inhibición por retroalimentación en los que los inhibidores detenían completamente la actividad de la enzima, en este caso la cantidad total de enzima inicial disminuye de manera escalonada y cae a cero cuando los tres productos están presentes en exceso.

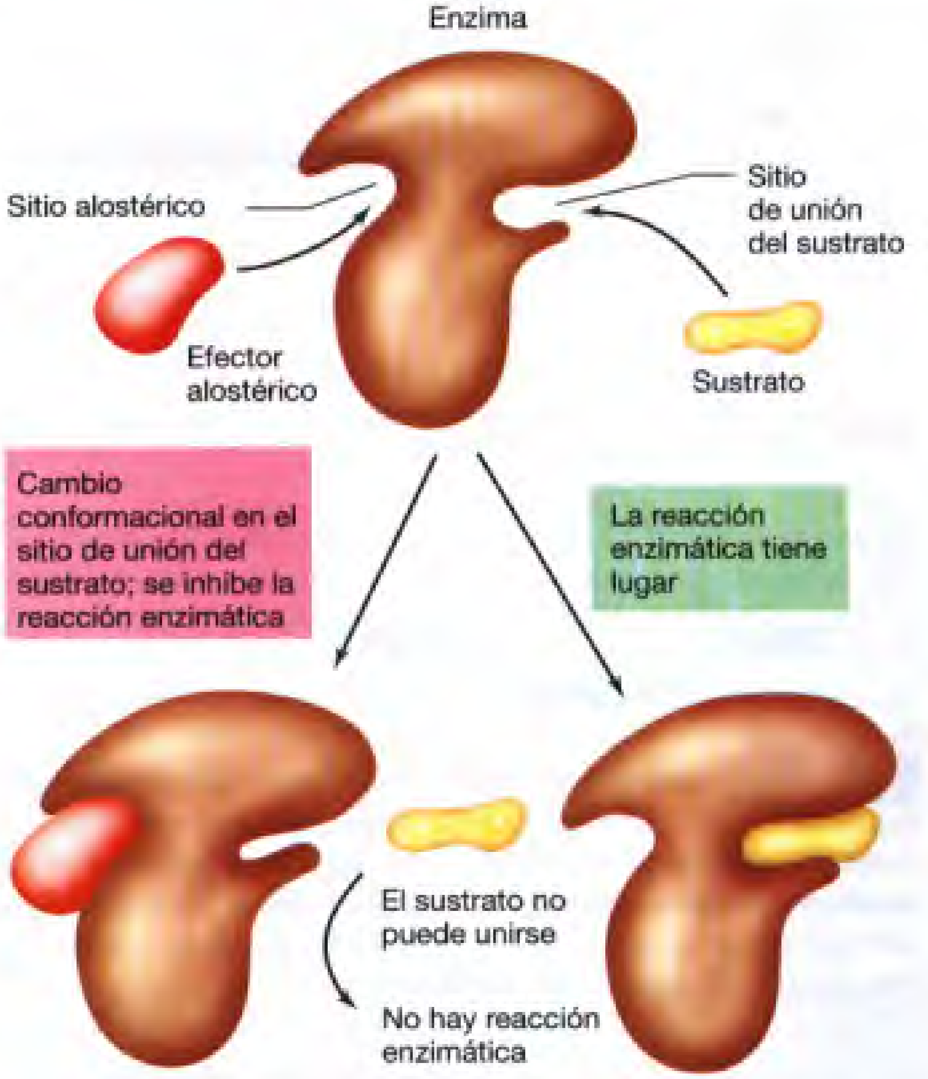

Enzima
Sitio alostérico
Sitio de unión del sustrato
Efector alostérico
Sustrato
Cambio conformacional en el sitio de unión del sustrato; se inhibe la reacción enzimática
La reacción enzimática tiene lugar
El sustrato no puede unirse
No hay reacción enzimática

Figura 8.3 Mecanismo de inhibición enzimática por un efector alostérico. Cuando el efector se combina con el sitio alostérico, se altera la conformación de la enzima de modo que el sustrato ya no puede unirse.

El interés del mecanismo de inhibición por retroalimentación supera el simplemente académico. En el Capí-

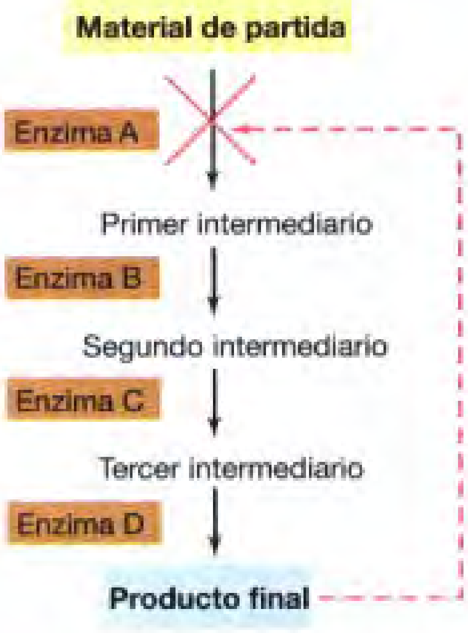

Material de partida
Enzima A
Primer intermediario
Enzima B
Segundo intermediario
Enzima C
Tercer intermediario
Enzima D
Producto final

Figura 8.2 Inhibición de la actividad enzimática por retroalimentación. La actividad de la primera enzima de la ruta es inhibida por el producto final, con lo que se controla a sí mismo.

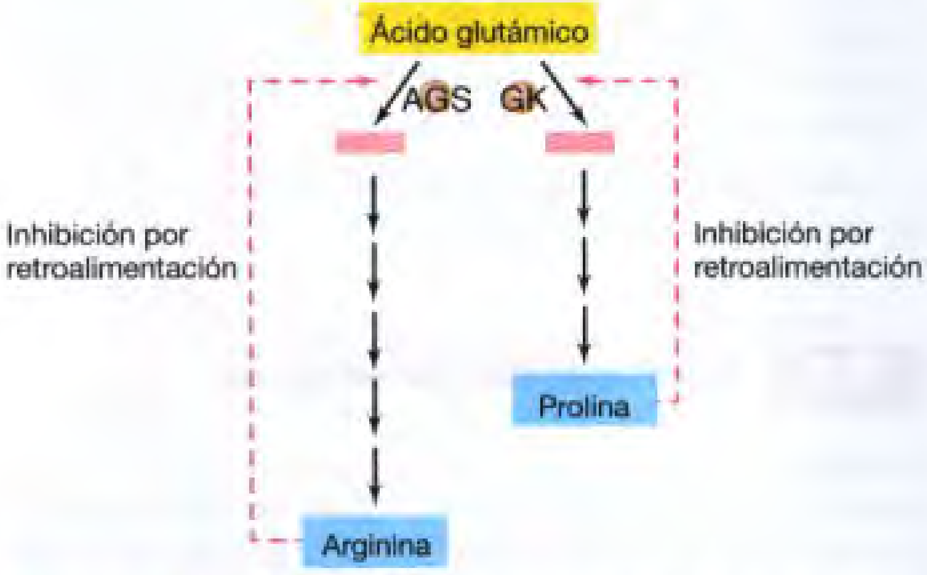

Ácido glutámico
AGS
GK
Inhibición por retroalimentación
Inhibición por retroalimentación
Prolina
Arginina

Figura 8.4 Inhibición por retroalimentación (flechas) en una ruta biosintética ramificada. En rosa, se muestra un intermediario clave de cada rama. Las enzimas inhibidas son *N*-acetil glutamato sintasa (AGS) y γ-glutamil quinasa (GK).

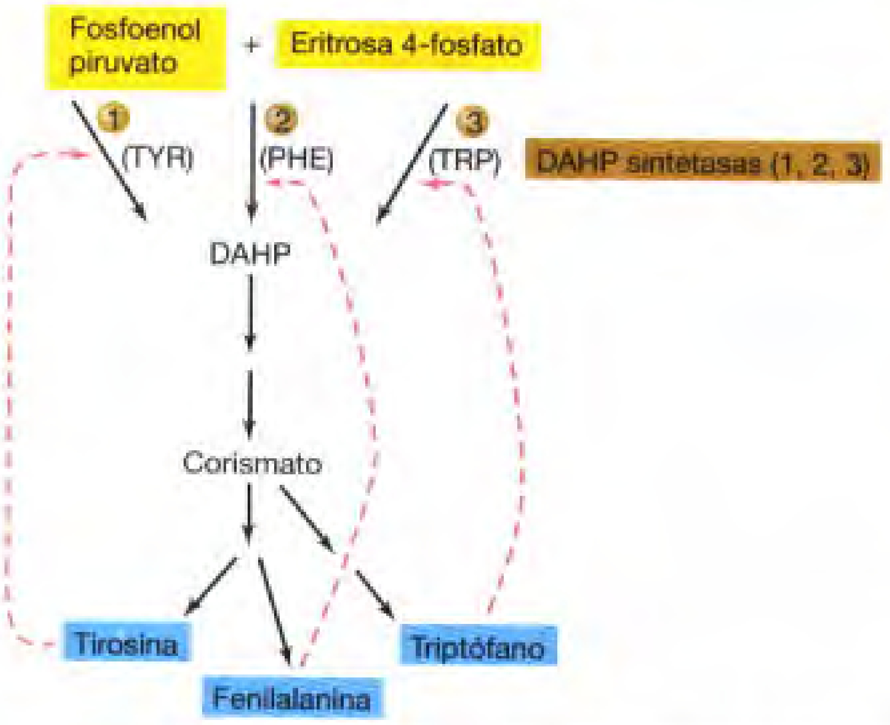


Figura 8.5 La ruta común que conduce a la síntesis de aminoácidos aromáticos contiene tres isoenzimas de DAHP sintetasa. (DAHP es 3-desoxi-D-*arabino*-heptulosonato 7-fosfato.) Cada una de estas enzimas es retroinhibida específicamente por uno de los aminoácidos aromáticos. Nótese que tiene que haber un exceso de los tres para inhibir completamente la síntesis de DAHP.

tulo 30, se verá como el conocimiento de la bioquímica de la inhibición por retroalimentación ha permitido a los microbiólogos industriales aislar mutantes que han perdido la capacidad de inhibir por retroalimentación la producción de un aminoácido específico. Estos mutantes son utilizados luego en la producción industrial a gran escala de aminoácidos como suplemento de alimentos (*véanse* Sección 30.7 y Figura 30.13).

✓ 8.2 *Revisión de conceptos*

Las reacciones metabólicas pueden regularse mediante el control de las actividades de las enzimas que catalizan estas reacciones. Un tipo importante de regulación de la actividad enzimática es la inhibición por retroalimentación, en la que el producto final de una ruta biosintética retroalimenta e inhibe la primera enzima exclusiva de esa ruta.

- ✓ ¿Qué es la *inhibición por retroalimentación*?
- ✓ ¿Qué es una *enzima alostérica*?

8.3 Modificación de enzimas

Se conocen varios ejemplos en bacterias en los que una enzima se regula por *modificación covalente*, generalmente por adición o eliminación de alguna pequeña molécula orgánica. Como en el caso de las proteínas alostéricas, la unión covalente del grupo modificador cambia la conformación de la proteína y puede alterar drásticamente su actividad catalítica. La eliminación del grupo modificante devuelve la enzima al estado inicial. Se conocen muchos ejemplos de modificación covalente, pero los mejor caracterizados son enzimas cuya actividad se ve afectada por unión del nucleótido monofosfato de adenosina (AMP) o difosfato de adenosina (ADP), por unión de fosfato inorgánico o por metilación.

Uno de los ejemplos más estudiados de una enzima alostérica regulada por adenilación (adición de AMP) es la glutamina sintetasa (GS), una enzima que tiene una función fundamental en el metabolismo del nitrógeno en la célula (*véase* Sección 5.15). GS se inhibe por retroalimentación por al menos ocho compuestos diferentes, tales como varios aminoácidos y compuestos implicados en el metabolismo de nucleótidos. La susceptibilidad de GS a la inhibición por retroalimentación se incrementa, y su actividad disminuye cuando las células se cultivan en medio con abundante nitrógeno (glutamina). Esto es debido a la adenilación de GS (Figura 8.6). Cada molécula de GS contiene 12 subunidades idénticas y cada una puede ser adenilada en un sitio particular. Cuando la en-

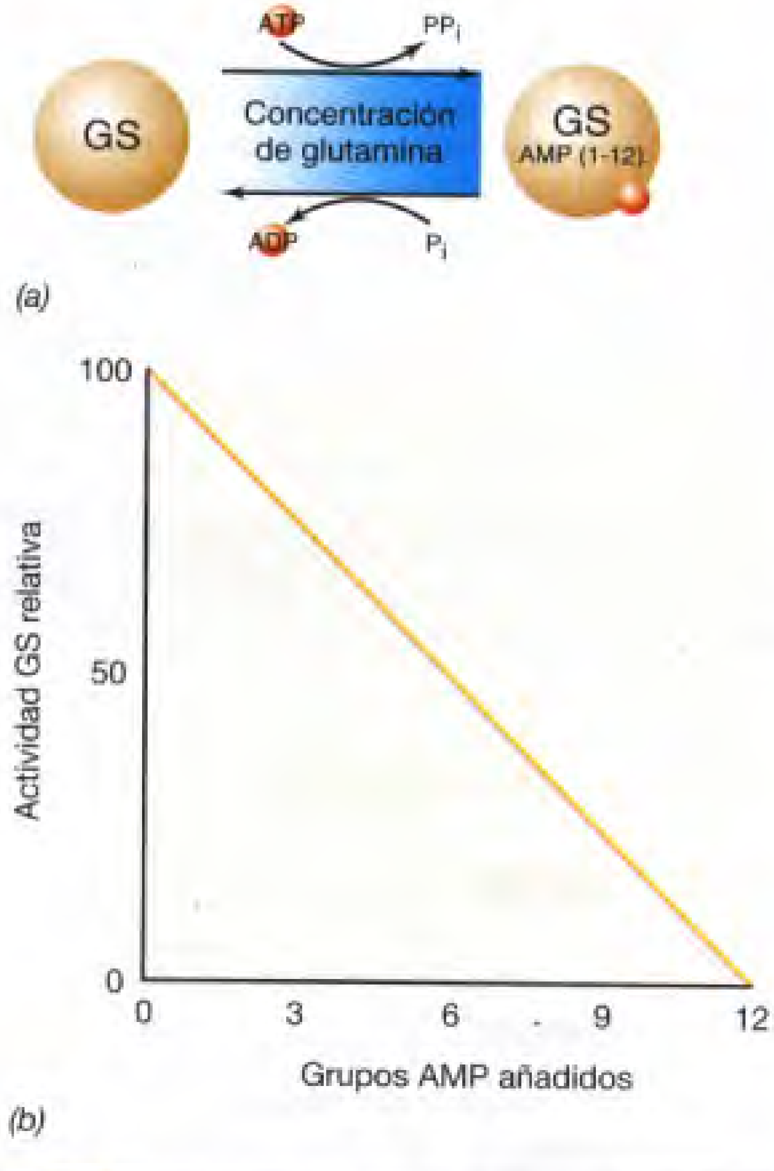


Figura 8.6 Regulación de la glutamina sintetasa por modificación covalente. (a) Cuando se cultivan las células en un medio rico en nitrógeno, la glutamina sintetasa (GS) es modificada covalentemente mediante una adenilación progresiva, pudiendo añadirse hasta 12 grupos adenilo (AMP). Cuando el nitrógeno escasea, los grupos son eliminados formándose ADP. (b) Las subunidades GS adeniladas son inactivas, de manera que la actividad global de GS decrece a medida que se adenilan más subunidades. Cualquier subunidad no adenilada permanece activa pero tiene aumentada su sensibilidad a la retroinhibición.

zima está completamente adenilada es esencialmente inactiva; cuando está parcialmente adenilada es parcialmente activa. Curiosamente, la enzima que adiciona y elimina el AMP se regula a su vez por modificación covalente.

La modificación covalente de enzimas con fines reguladores, tal como la adenilación de GS, puede revertirse rápidamente. Sin embargo, no toda modificación postraduccional de las proteínas es reversible. En algunos casos, el polipéptido recién sintetizado debe procesarse extensivamente para convertirse en una enzima activa (*véase* el recuadro, «Procesamiento de proteínas»).

✓ 8.3 Revisión de conceptos

La modificación covalente es un mecanismo regulador que cambia temporalmente la actividad de una enzima. Las enzimas reguladas de esta manera pueden ser modificadas y esta modificación puede eliminarse posteriormente. Un tipo de modificación es la adenilación (adición de AMP).

✓ ¿Cómo afecta la modificación covalente a la actividad de una enzima?

✓ ¿Cómo una modificación covalente puede afectar «temporalmente» a la actividad de una enzima?

III REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN: CONTROL POSITIVO Y CONTROL NEGATIVO

El control de la actividad enzimática por inhibición, por retroalimentación o por modificación covalente puede parecer suficiente para la regulación de la expresión génica, pero no lo es. Incluso aunque la glutamina sintetasa (GS) esté sujeta a ambos tipos de regulación, el nivel de la proteína GS aumenta o disminuye dependiendo del nivel de nitrógeno en el medio. A lo largo de este capítulo, discuti-

Atención a... Procesamiento de proteínas

En el Capítulo 7 se describió el procesamiento del RNA (*véase* Sección 7.12). Mencionamos que *todos* los tRNA y rRNAs se transcriben como parte de una molécula de RNA más larga y luego se cortan hasta alcanzar el tamaño correcto. Las proteínas también pueden procesarse. Como ya se mencionó en el Capítulo 7, todas las proteínas se sintetizan comenzando con metionina, una metionina formilada en *Bacteria*. Así, cabría esperar que cualquier proteína aislada de la célula tuviera una metionina en su extremo amino terminal. Sin embargo, este no es el caso, ya que la mayoría de las proteínas ha eliminado la metionina por una enzima específica. (En *Bacteria* se elimina primero el grupo formilo de la metionina en todas las proteínas.)

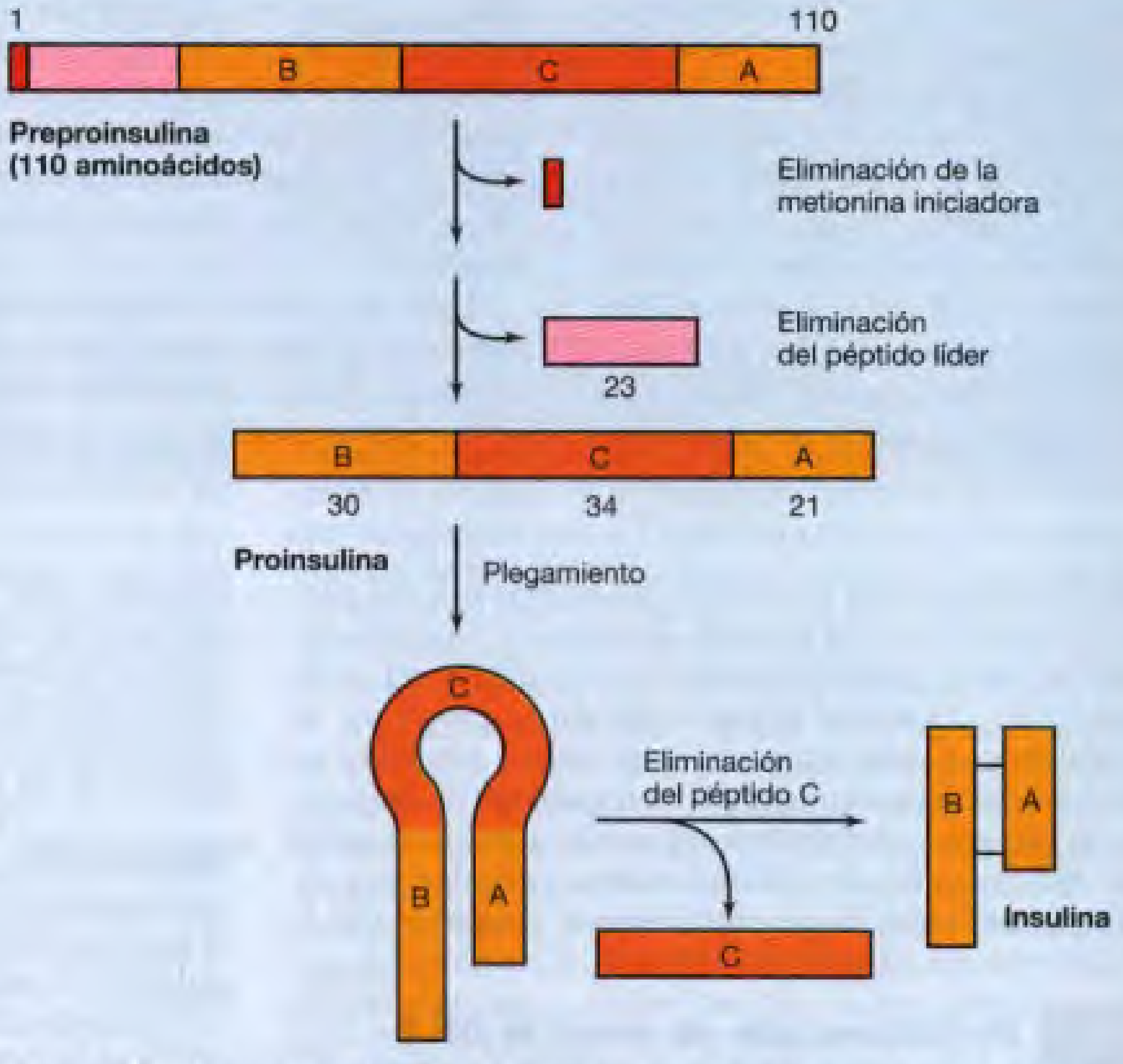

1
110
B
C
A
Preproinsulina
(110 aminoácidos)
Eliminación de la metionina iniciadora
Eliminación del péptido líder
23
B
C
A
30
34
21
Proinsulina
Plegamiento
C
B
A
Eliminación del péptido C
B
A
C
Insulina

Figura 1 **Procesamiento de la preproinsulina. La metionina inicial es eliminada de la cadena antes de que se sintetice la molécula completa de preproinsulina. Tras la eliminación del péptido líder, la molécula de insulina se pliega y el péptido C se elimina originando las cadenas A y B de la insulina. Estas cadenas quedan unidas por puentes disulfuro (*véase* Sección 3.8)**

También se comentó el hecho de que las proteínas de secreción se sintetizan con una secuencia líder que es eliminada durante el transporte (*véase* Sección 7.16). En algunos casos, el producto final activo es el resultado de un procesamiento extensivo del producto de transcripción. Éste es el caso de las hormonas peptídicas sintetizadas por los organismos superiores. Un ejemplo simple lo constituye la hormona insulina. La insulina es importante en la regulación del metabolismo de los carbohidratos en ma-

continúa

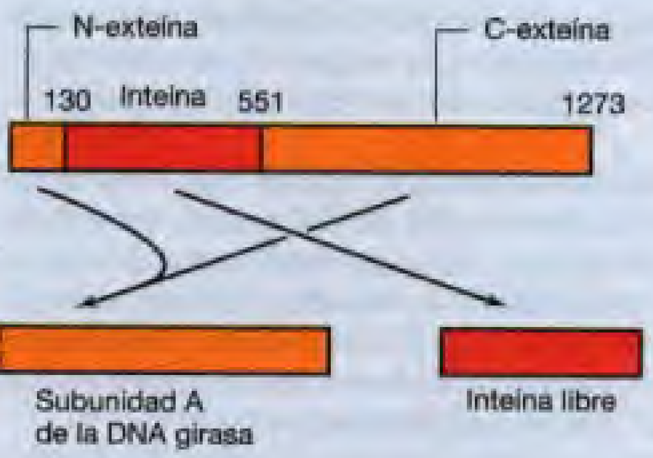


Figura 2 Procesamiento de proteínas. La proteína sintetizada a partir del mRNA de *gyrA* en *Mycobacterium leprae* tiene una longitud de 1273 aminoácidos (10 veces la longitud de la preproinsulina mostrada en la Figura 1). N-exteína y C-exteína corresponden al amino-terminal y carboxilo-terminal de la exteína respectivamente. Los residuos 131 a 550 corresponden a la inteína, que se autoelimina en una reacción de corte y empalme que genera la inteína libre y la subunidad A de la DNA girasa.

míferos y se utiliza para tratar la diabetes. La insulina deriva de una proteína de 110 aminoácidos llamada proinsulina, como se muestra en la Figura 1. El («pre») péptido líder se elimina durante la secreción para originar la proinsulina, la cual es cortada aún más para producir la molécula final de insulina activa compuesta de una cadena A y una cadena B.

Algunos genes se traducen para originar una «poliproteína», es decir, una gran cadena polipeptídica, que se procesan para originar varios productos activos diferentes. Cuando describamos los poliovirus (*véase* Sección 16.7) y los retrovirus (*véase* Sección 9.12), veremos varios ejemplos.

Cuando los intrones se eliminan durante el procesamiento del RNA de los retrovirus, las secuencias flanqueantes —los exones— son ligados para formar una sola molécula (*véase* Sección 7.12). Recientemente se han descubierto una serie de casos donde la información «extra» del gen es eliminada en la *proteína* y no en el RNA. El proceso se ha denominado «procesamiento de proteínas» y el péptido interno eliminado se denomina **inteína**. Este proceso se ha demostrado que ocurre en proteínas específicas de *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya*. En la Figura 1, se muestra el proceso en el producto del gen *gyrA* de la bacteria *Mycobacterium leprae*. Nótese que las secuencias flanqueantes, denominadas *exteínas*, son ligadas para formar una única proteína, en este caso una subunidad de la DNA girasa. Las inteínas se autoprocesan y la propia proteína inteína es una proteasa específica (una enzima que corta proteínas). Recuérdese que muchos intrones se autocortan y empalman (*véase* Sección 7.12).

Al igual que ocurría con el RNA, muchas otras etapas de «procesamiento» son posibles con las proteínas. Ya mencionamos que el tRNA contiene muchas bases modificadas y que la modificación se produce después de la transcripción (*véase* Sección 7.14). De igual manera, hay muchos más de 20 o 21 aminoácidos (*véase* recuadro en el Capítulo 7, «Selenocisteína, el aminoácido vigésimo primero») conocidos en las proteínas, que son el resultado de modificaciones covalentes post-traduccionales. A veces las modificaciones covalentes son reversibles y pueden ser importantes maneras de regular la actividad enzimática (*véase* Sección 8.2). ■

remos los mecanismos por los que las células pueden controlar la *cantidad* de una proteína sintetizada. Nuestra discusión se ceñirá principalmente al control a nivel de la transcripción. Para que la transcripción se produzca, la RNA polimerasa debe reconocer un promotor específico en el DNA y comenzar a funcionar. La regulación de la transcripción implica generalmente a proteínas que se unen al DNA. Así, antes de discutir mecanismos reguladores específicos, trataremos de las proteínas que se unen al DNA.

8.4 Proteínas que se unen al DNA

A menudo, moléculas pequeñas están implicadas directamente en la regulación de la actividad de las proteínas. En el ejemplo mostrado en la Figura 8.4, los aminoácidos prolina y arginina se unen directamente a la enzima y la inhiben. En la regulación de la *síntesis* de enzimas, la situación es bastante diferente. Aunque las moléculas pequeñas están frecuentemente implicadas en la regulación de la transcripción, rara vez lo hacen directamente. Sin embargo, afectan a la unión de ciertas proteínas llamadas *proteínas reguladoras*, a sitios específicos en el DNA, y son estas últimas proteínas las que realmente regulan la transcripción. En esta sección discutiremos unas cuantas propiedades generales de las proteínas que se unen al DNA.

Interacción de proteínas con ácidos nucleicos

Las interacciones proteína–ácido nucleico son cruciales en la replicación, transcripción y traducción, así como en la regulación de estos procesos. Podemos distinguir dos tipos interacciones proteína-ácido nucleico: no específicas y específicas, dependiendo de si la proteína se une a *cualquier sitio* de la cadena de ácido nucleico o de si la interacción es específica de una secuencia. Como un ejemplo de proteínas que *no* interaccionan con una secuencia específica mencionaremos las **histonas**, proteínas que son extremadamente importantes en la estructura del cromosoma eucariótico (*véase* Sección 7.3), aunque son menos importantes en procariotas. Las histonas son moléculas relativamente pequeñas que tienen una alta proporción de aminoácidos cargados positivamente (arginina, lisina e histidina). El DNA tiene un gran número de grupos fosfato cargados negativamente hacia el exterior de la doble hélice. Dada su carga positiva, las histonas se combinan fuerte y relativamente con poca especificidad con el DNA cargado negativamente. La asociación de las histonas con el DNA conduce a la formación de nucleosomas, las unidades particuladas del cromosoma eucariótico (*véase* Sección 7.3). Estos nucleosomas son compactados aún más en estructuras de orden superior para hacer el DNA inaccesible. Si el DNA está cubierto con histonas, otras proteínas tales como la RNA polimerasa no será capaz de unirse y no será posible la transcripción. Ciertas proteínas pueden deshacer la estructura condensada del DNA. Sin embargo, la pérdida de histonas no necesita conducir automáticamente a la transcripción sino, simplemente, deja el gen en disposición de ser activado por otros factores. Incluso después de la unión y comienzo de la transcripción, las RNA polimerasas eucarióticas necesitan factores proteicos específicos para ayudarlas a elongar el RNA a través del DNA recubierto de proteína.

Existe un número de proteínas que interaccionan con el DNA de una manera *específica de secuencia*. Estas interacciones se producen por asociación de las cadenas laterales de los aminoácidos de las proteínas con las bases, así como con el fosfato y los azúcares. El surco mayor del DNA es, en virtud de su tamaño, un lugar importante en la unión de proteínas. La Figura 7.3 identifica varios de los átomos de los pares de bases presentes en el surco mayor que interactúan con proteínas. Para conseguir la *especificidad* requerida en dichas interacciones, la proteína debe interactuar simultáneamente con más de una base del ácido nucleico, frecuentemente con varias. Esto significa que una proteína con una secuencia específica de aminoácidos interaccionará con una secuencia específica de bases en el DNA.

Ya se ha descrito una estructura en el DNA denominada *repetición invertida* (*véase* Figura 7.6). Tales repeticiones invertidas son frecuentemente los lugares en los que las moléculas de proteína se combinan específicamente con DNA (Figura 8.7). Nótese que esta interacción no involucra la formación de estructuras cruciformes en el DNA. Las proteínas que interaccionan específicamente con el DNA son frecuentemente *dímeros*, compuestos de dos cadenas polipeptídicas idénticas. En cada cadena polipeptídica existe una región, llamada *dominio*, que interacciona específicamente con una región del DNA en el surco mayor. Cuando la proteína interactúa con los dímeros de las repeticiones invertidas, *cada uno* de los dímeros de la proteína se combina con cada una de las cadenas del DNA (Figura 8.7). Dado que la proteína reconoce *puntos de contacto* asociados con pares de bases específicos, su unión es específica de secuencia.

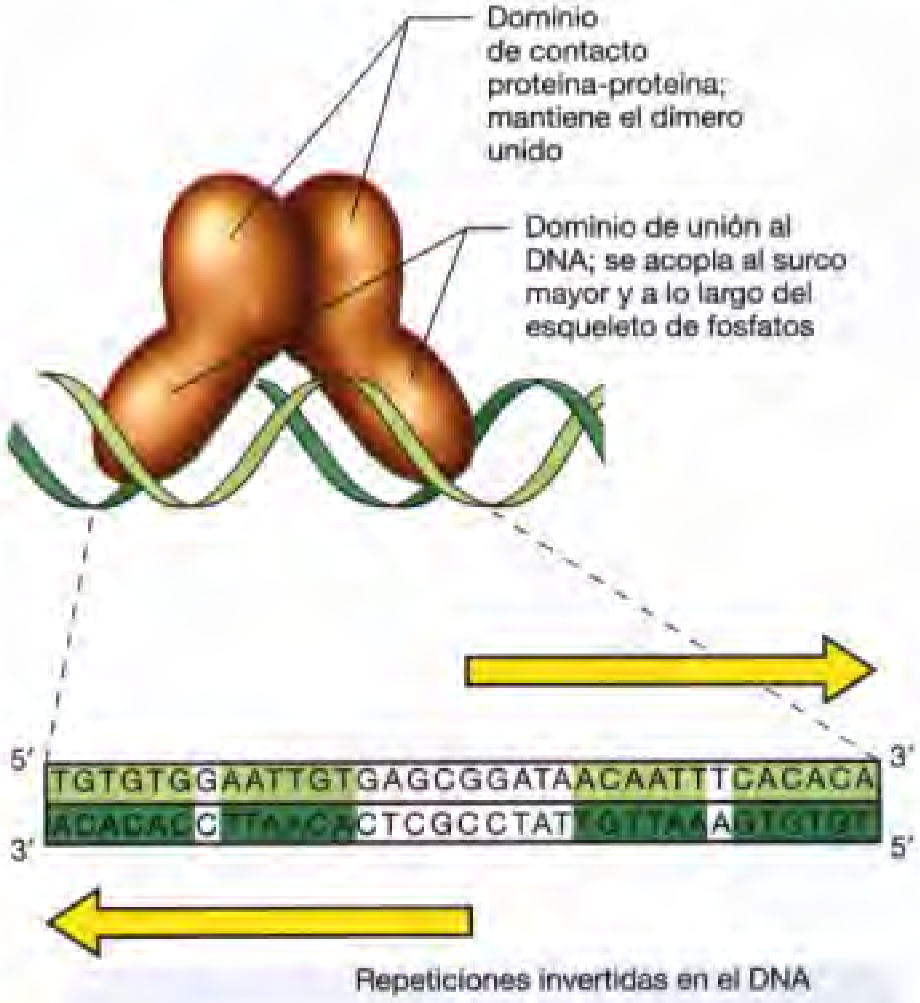

Dominio de contacto proteína-proteína; mantiene el dímero unido
Dominio de unión al DNA; se acopla al surco mayor y a lo largo del esqueleto de fosfatos
5'
3'
TGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACA
ACACACCTTAACACTCGCCTATTGTTAAAGTGTGT
3'
5'
Repeticiones invertidas en el DNA

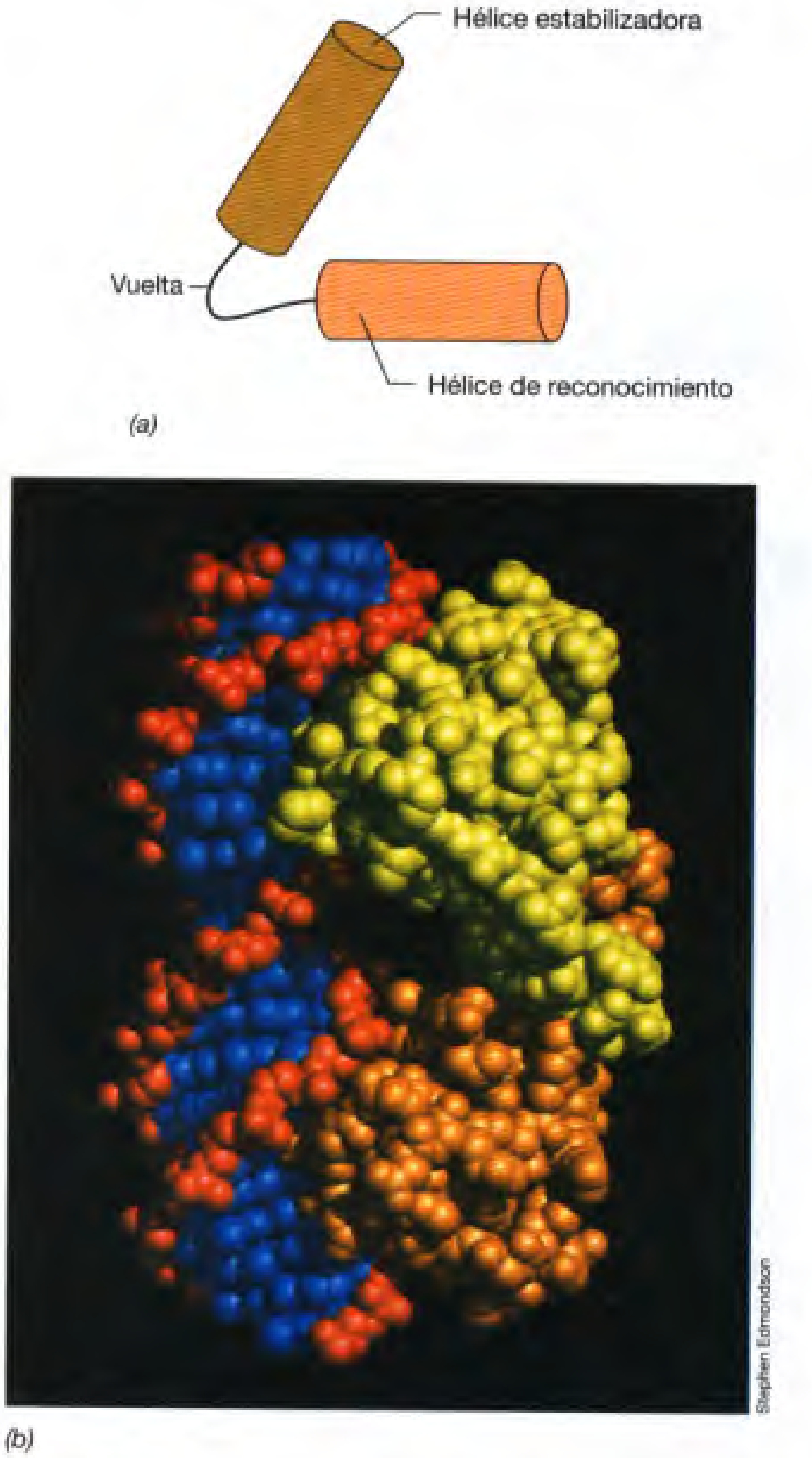
Figura 8.7 Proteínas que se unen al DNA. Muchas proteínas son dímeros que se combinan específicamente con *dos* sitios en el DNA. Las secuencias específicas en el DNA que interaccionan con la proteína son *repeticiones invertidas*. Se muestra la secuencia de nucleótidos del operador del operón lactosa y, en sombreado, se muestran las repeticiones invertidas, que son los sitios de contacto del represor *lac* con el DNA.

Estructura de las proteínas que se unen al DNA

Los estudios de la estructura de varias proteínas que se unen al DNA, tanto de procariotas como de eucariotas, han revelado algunos tipos comunes de subestructuras proteicas comunes que son aparentemente críticas para la unión correcta de muchas de estas proteínas al DNA. Uno de éstos se denomina *motivo hélice-vuelta-hélice* (Figura 8.8). El motivo hélice-vuelta-hélice está formado por una secuencia de aminoácidos que forman una estructura secundaria de α-hélice (la denominada hélice de reconocimiento que interactúa con el DNA), la cual está unida a una secuencia de tres aminoácidos, el primero de los cuales es generalmente una glicina que funciona para «curvar» la proteína (Figura 8.8*a*). El otro extremo de la «vuelta» está conectado con una segunda hélice que estabiliza la primera por interacciones hidrofóbicas, y participa en la dimerización (*véase* más arriba). El reconocimiento de secuencias específicas de DNA se produce por una combinación de interacciones no covalentes, incluyendo puentes de hidrógeno y contactos de van der Walls (*véase* Sección 3.1) entre la proteína y los pares de bases del DNA. Muchas proteínas de unión al DNA de *Bacteria* muestran la estructura hélice-vuelta-hélice, entre las que se encuentran muchas proteínas represoras tales como el represor del bacteriófago lambda (Figura 8.8*b*) y los represores *lac* y *trp* de *Escherichia coli* (*véase* Sección 8.4). Se conocen más de 250 proteínas con este motivo que se unen al DNA para regular la transcripción.

Otros dos tipos de subestructuras son comunes en las proteínas que se unen al DNA. Uno de éstos, el *dedo de zinc*, es muy común en proteínas reguladoras de eucariotas. El dedo de zinc es una subestructura de la proteína que, como su nombre indica, une un ion de zinc (Figura 8.9*a*). Lo más probable es que parte del «dedo» de aminoácidos creado forme una α-hélice y ésta interactúe con el DNA en el surco mayor. Típicamente existen al menos dos de tales dedos en la proteína implicada en la unión. La otra subestructura proteica frecuentemente encontrada en el DNA es la *cremallera de leucina*. Esta subestructura está formada por las cadenas laterales de residuos de leucina espaciados cada siete aminoácidos, lo que de alguna manera recuerda a una cremallera. A diferencia de la hélice-vuelta-hélice, la cremallera de leucina no parece interaccionar con el propio DNA pero sirve para mantener otras dos hélices en la posición correcta para unirse al DNA (Figura 8.9*b*).

Una vez que una proteína se combina con un sitio específico del DNA, puede producirse un número de efectos. En algunos casos, la proteína es una enzima que ejerce alguna acción específica en el DNA, tal como la RNA polimerasa, que hace RNA utilizando DNA como molde. En otros casos, la proteína que se une puede *bloquear* la transcripción (regulación negativa, *véase* Sección 8.5) o puede *activarla* (regulación positiva, *véase* Sección 8.6).



Stephen Edmondson

Figura 8.8 Estructura hélice-vuelta-hélice de algunas proteínas que se unen al DNA. (a) Modelo simplificado de los elementos de la hélice-vuelta-hélice. (b) Modelo por computadora del represor del bacteriófago lambda, una proteína típica del tipo hélice-vuelta-hélice. Una subunidad del represor dimérico se representa en marrón oscuro y la otra en amarillo oscuro. Cada subunidad contiene una estructura hélice-vuelta-hélice. Las coordenadas para generar esta imagen fueron obtenidas de la Base de Datos de Proteínas, Brookhaven, NY.

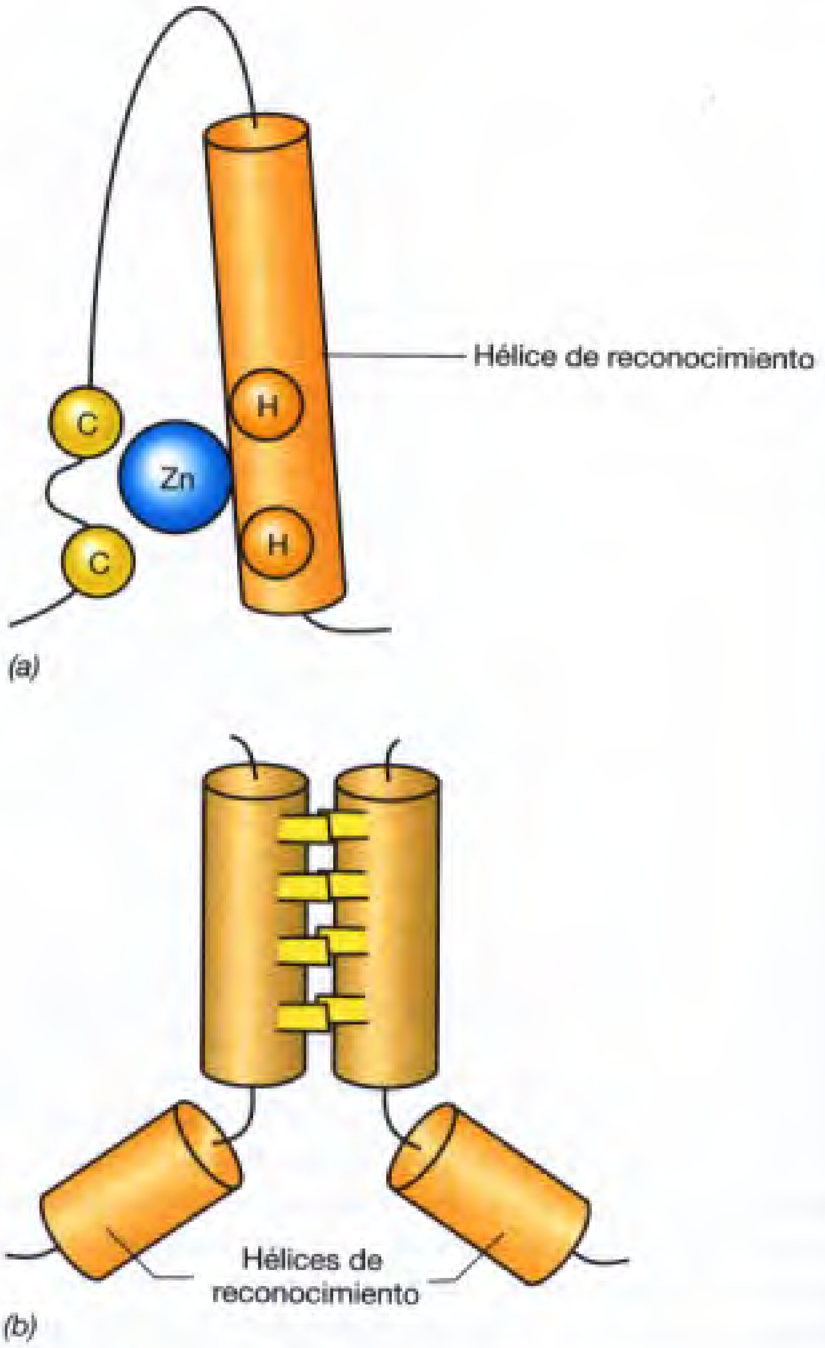


Figura 8.9 Modelos simplificados de subestructuras encontradas en proteínas eucarióticas que se unen al DNA. Las α-hélices están representadas por cilindros. Las hélices de reconocimiento son los dominios implicados en la unión al DNA. (a) Estructura del dedo de zinc. Los aminoácidos que mantienen el zinc en su posición siempre incluyen dos residuos de cisteína (C) siendo los otros histidinas (H). (b) Estructura de la cremallera de leucina. Los residuos de leucina (mostrados en amarillo) están espaciados exactamente cada siete aminoácidos. La interacción entre las cadenas laterales de las leucinas ayuda a mantener las dos hélices juntas.

✓ 8.4 Revisión de conceptos

Ciertas proteínas pueden unirse al DNA a causa de interacciones específicas entre ciertas regiones de las proteínas y regiones específicas del DNA. En algunos casos, las interacciones no son específicas de secuencia, pero en otros sí. Las proteínas que se unen a ácidos nucleicos pueden ser enzimas que usan los ácidos nucleicos como sustratos, o pueden ser proteínas reguladoras que afectan a la función de los genes.

- ✓ ¿Qué es un *dominio* proteico?
- ✓ ¿Por qué algunas interacciones son específicas de ciertas secuencias en el DNA?

8.5 Control negativo de la transcripción: represión e inducción

La transcripción es la primera etapa en el flujo de la información biológica donde es relativamente simple incrementar la expresión de un gen con respecto a otro. Si un gen se transcribe con más frecuencia que otro, habrá mayor abundancia de su mRNA en la célula y, por tanto, una mayor cantidad de la proteína correspondiente. Incluso las proteínas constitutivas pueden ser requeridas en diferentes cantidades. Altos niveles de transcripción son consecuencia de que el promotor del gen se acerca a la *secuencia consenso* (*véase* Sección 7.9), mientras que se producen altos niveles de traducción si la secuencia Shine-Dalgarno del gen es complementaria con el rRNA 16S (*véase* Sección 7.15). Estas secuencias están fijadas y sirven para mantener la expresión de un gen a un nivel determinado.

En el resto del capítulo no trataremos, sin embargo, de las fuerzas relativas de los diferentes promotores o de la eficiencia de la iniciación de la transcripción de un mRNA particular, sino sobre cómo puede alterarse de una manera regulada el nivel de expresión de un gen individual.

En la Sección 8.2, consideramos cómo las células regulan la *actividad* enzimática. Ahora, comenzaremos a considerar cómo las células regulan la *síntesis* de enzimas.

Se conocen varios mecanismos diferentes para controlar la síntesis de enzimas en bacterias, y todos están muy influenciados por el *ambiente* en el que el organismo está creciendo, en particular por la presencia o ausencia de pequeñas moléculas específicas. Estas moléculas pueden interaccionar con proteínas específicas, como las proteínas que se unen al DNA que acabamos de describir, y controlan la transcripción, o, más raramente, la traducción.

Comenzamos nuestra discusión describiendo la represión y la inducción, formas simples de regulación que gobiernan la expresión génica a nivel de *transcripción*. En esta sección abordaremos solamente el control negativo de la transcripción; un tipo de control cuyo mecanismo regulador implica la parada en la transcripción.

Represión enzimática

Frecuentemente, las enzimas que catalizan la síntesis de un producto específico no se sintetizan si este producto está presente en el medio. Por ejemplo, las enzimas implicadas en la formación del aminoácido arginina son sintetizadas sólo cuando la arginina está *ausente* del medio de cultivo; la adición de arginina al medio *reprime* la síntesis de estas enzimas. Como se indica en la Figura 8.10, si se añade arginina a un cultivo creciendo exponencialmente en un medio carente de este aminoácido, el crecimiento continúa a la misma velocidad, pero la formación de las enzimas implicadas en la síntesis de arginina se detiene. Nótese que se trata de un efecto *específico*, ya que la síntesis del resto de las enzimas de la célula continúa a la misma velocidad.

La represión enzimática es un fenómeno muy común en bacterias; se produce como un mecanismo de control de la síntesis de una amplia variedad de enzimas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos, purinas y pirimidinas. En casi todos los casos, es el producto final de una ruta biosintética particular el que reprime las enzimas de la ruta. En estos casos, la represión es bastante específica y el proceso no suele tener efecto en el resto del metabolismo celular. La importancia de este mecanismo para el organismo es obvia ya que garantiza que el organismo no gasta energía en la síntesis de enzimas innecesarias.

Inducción enzimática

Un fenómeno complementario a la represión es la *inducción enzimática*, en la que la síntesis de una enzima sólo se produce cuando su sustrato está presente. La Figura 8.11 muestra este proceso en el caso de la enzima β-galactosidasa, implicada en la utilización de la lactosa. Si la lactosa está ausente del medio, la enzima no se sintetiza, pero su síntesis comienza casi inmediatamente después de la adición de lactosa. Las enzimas implicadas en el catabolismo

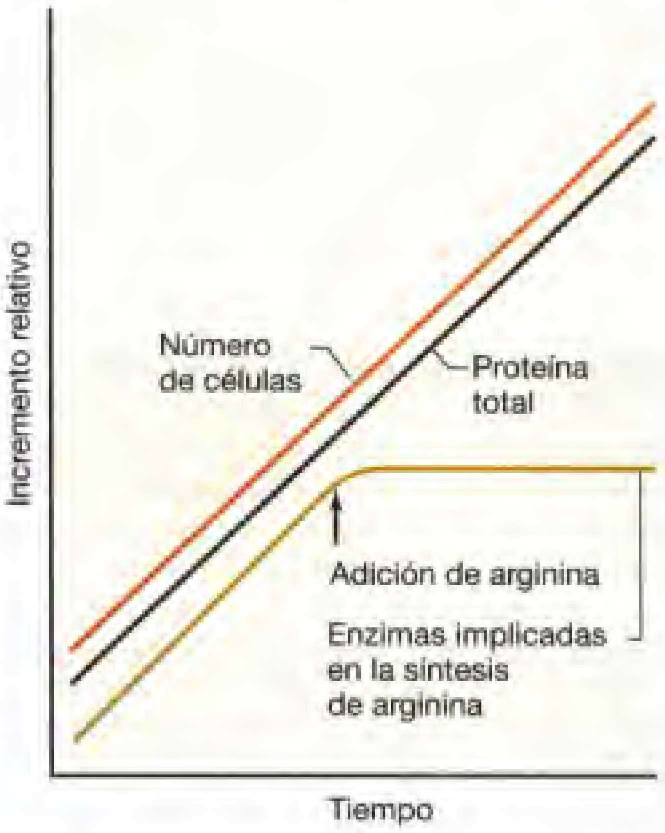


Figura 8.10 Represión de las enzimas implicadas en la síntesis de arginina por adición de arginina al medio. Nótese que la velocidad de síntesis de proteínas no se modifica.

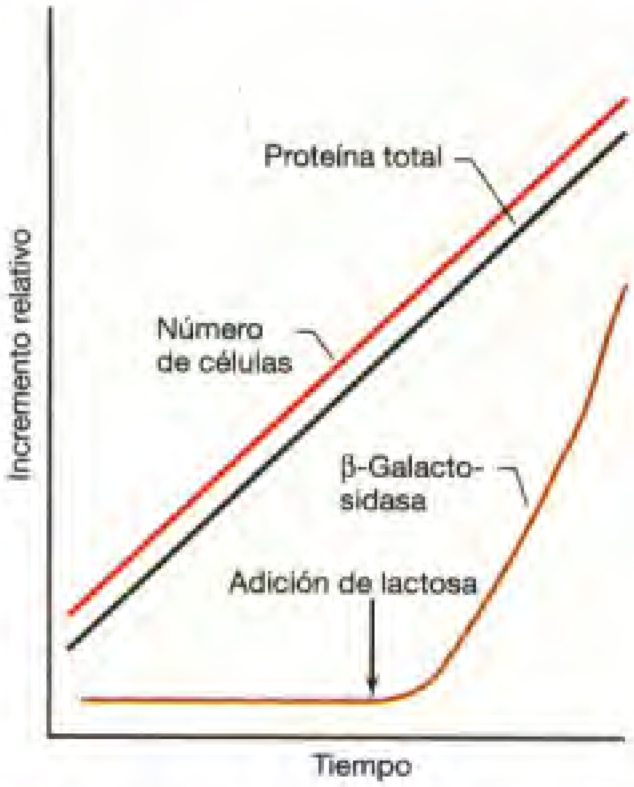


Figura 8.11 Inducción de la enzima β-galactosidasa al añadir lactosa al medio. Nótese que la velocidad de síntesis de proteínas no se modifica.

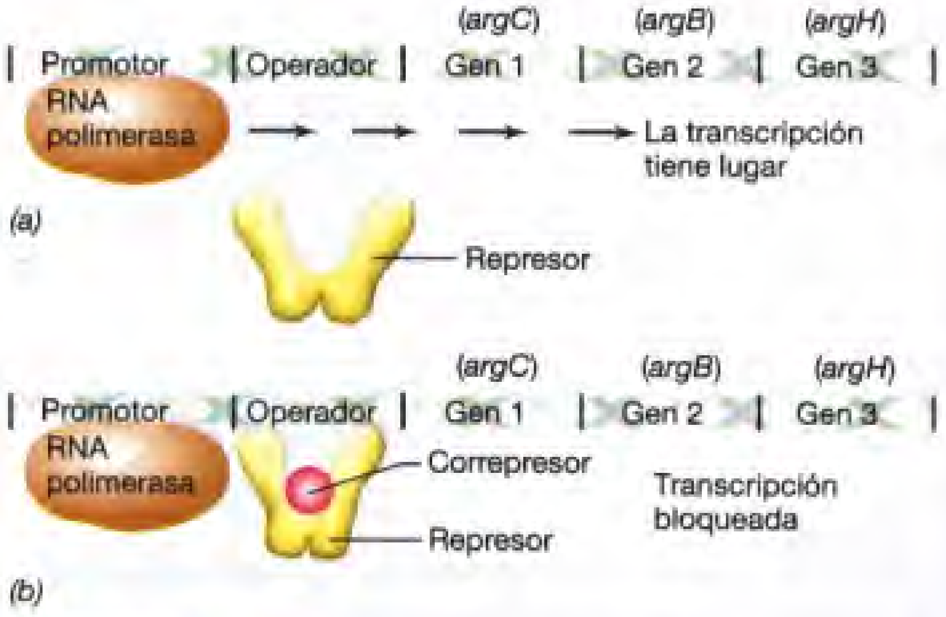


Figura 8.12 Proceso de la represión enzimática. (a) La transcripción del operón ocurre porque el represor es incapaz de unirse al operador. (b) Una vez que un correpresor (molécula pequeña) se une al represor, el represor se une al operador y bloquea la transcripción; no se sintetizan ni el mRNA ni las proteínas que codifica. En el caso del operón *argCBH*, el represor sería el represor de la arginina y el correpresor el aminoácido arginina.

de fuentes de carbono y energía son frecuentemente inducibles. De nuevo, es posible apreciar el valor de este mecanismo para el organismo, ya que proporciona un medio de impedir la síntesis de una enzima hasta que no se necesita.

La sustancia que inicia la inducción enzimática se llama **inductor**, y la sustancia que reprime la producción se llama **correpresor**; estas sustancias, que son siempre pequeñas moléculas, a menudo se denominan colectivamente **efectores**. No todos los inductores y correpresores son sustratos o productos finales de las enzimas de la ruta. Por ejemplo, los *análogos* de estas sustancias pueden inducir o reprimir incluso cuando no sean sustratos de la enzima. El isopropiltiogalactósido (IPTG) es un inductor de la β-galactosidasa aun cuando no es hidrolizado por la enzima. No obstante, en la naturaleza, los inductores y correpresores son probablemente metabolitos celulares normales.

Mecanismo de represión e inducción

La inducción o represión de enzimas ocurre a nivel de transcripción; la síntesis de enzimas se controla por la iniciaciación o terminación de la producción de mRNA para una enzima particular o un grupo de enzimas. ¿Cómo pueden los inductores y correpresores afectar a la transcripción de una manera específica? Lo hacen indirectamente, combinándose con proteínas reguladoras específicas que, a su vez, afectan la síntesis de RNA. En el caso de una enzima reprimible, el correpresor (por ejemplo, la arginina) se combina con una **proteína represora** específica o represor, el represor de arginina, que está presente en la célula (Figura 8.12). El represor es una proteína alostérica (*véanse* Secciones 8.2 y 8.4), que altera su conformación cuando el correpresor se combina con él. Este represor alterado puede combinarse con una región específica del DNA cerca del promotor del gen, la **región operadora**. Esta región dio su nombre al operón, que, como ya se ha indicado (*véase* Sección 7.11), es un grupo de genes cuya expresión está bajo el control de un único operador. Todos los genes de un operón se transcriben como una unidad originando un único mRNA. El operador está cerca del promotor, que es donde se inicia la síntesis de mRNA. Si el represor se une al operador, se bloquea la síntesis de mRNA, ya que la RNA polimerasa no puede unirse o continuar (dependiendo de la localización exacta del operador). Así, la proteína o proteínas especificadas por este mRNA no pueden ser sintetizadas. Si el mRNA es policistrónico, *todas* las proteínas codificadas por este mRNA estarán reprimidas.

La inducción enzimática puede controlarse también por un represor. En este caso, la situación es la contraria a la que acabamos de describir. El represor es activo en *ausencia* del inductor, estando completamente bloqueada la síntesis de mRNA, pero cuando se añade el inductor se combina con el represor y lo inactiva. Una vez superada la inhibición de la síntesis de mRNA, pueden sintetizarse la enzima o enzimas en cuestión (Figura 8.13). Todos los sistemas que implican represores comparten un mismo mecanismo, que es la *inhibición* de la síntesis de mRNA por la acción de represores específicos que están a su vez bajo el control de pequeñas moléculas específicas, inductores y correpresores. Dado que la acción de los represores es inhibitoria, la regulación por este mecanismo se conoce normalmente como *control negativo*.

✓ 8.5 Revisión de conceptos

La cantidad de una enzima en la célula puede controlarse aumentando (inducción) o disminuyendo (represión) la cantidad de mRNA que codifica la enzima. La regulación transcripcio-

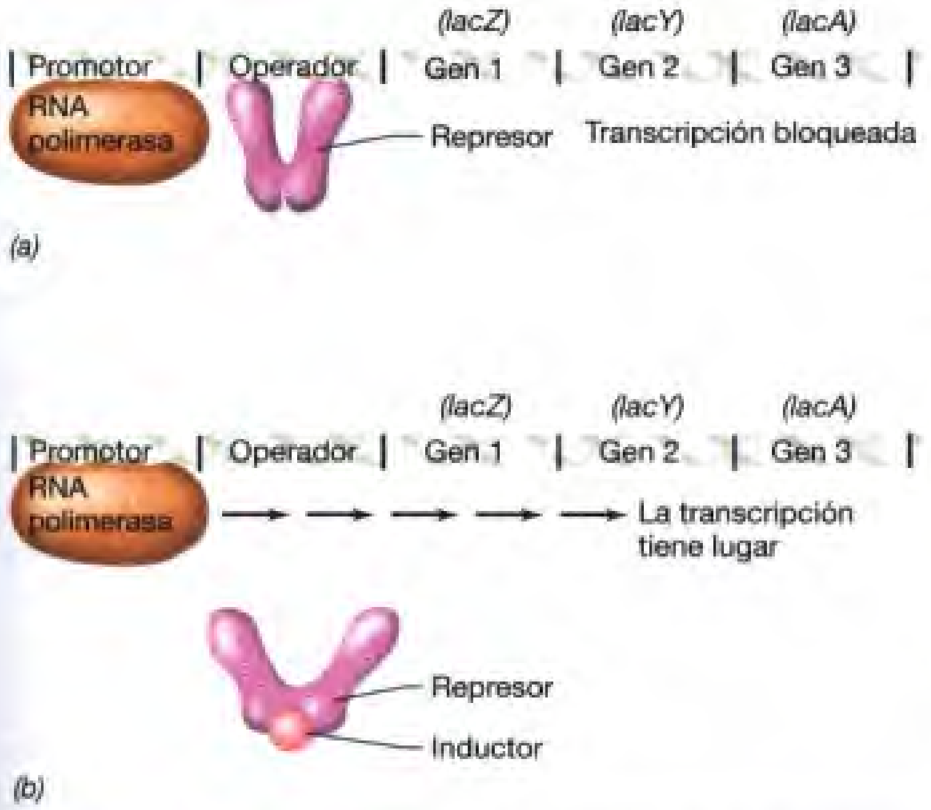

(a)
Promotor
Operador
(lacZ) Gen 1
(lacY) Gen 2
(lacA) Gen 3
RNA polimerasa
Represor
Transcripción bloqueada
(b)
Promotor
Operador
(lacZ) Gen 1
(lacY) Gen 2
(lacA) Gen 3
RNA polimerasa
La transcripción tiene lugar
Represor
Inductor

Figura 8.13 Proceso de inducción enzimática utilizando un represor. (a) Una proteína represora se une a la región del operador y bloquea la acción de la RNA polimerasa. (b) Una molécula inductora se une al represor y lo inactiva de manera que no puede unirse ya al operador. La RNA polimerasa transcribe y se forma el mRNA de ese operón. En el caso del operón *lac* el represor sería el represor *lac*, y el inductor sería allolactosa.

nal implica proteínas reguladoras que se unen al DNA y a pequeñas moléculas llamadas efectores. En el control negativo de la transcripción, la proteína reguladora se denomina represor y funciona inhibiendo la síntesis de mRNA.

- ✓ ¿Qué es el «control negativo» de la transcripción?
- ✓ ¿Cómo inhibe un represor la síntesis de mRNA específico?

8.6 Control positivo de la transcripción

La represión representa un tipo de regulación llamado **control negativo**. El elemento controlador -la proteína represora- produce la *represión* de la síntesis de mRNA. Aunque el represor tiene un papel negativo, un sistema que utiliza un represor puede controlar la inducción enzimática, como vimos en el caso de la β-galactosidasa. Sin embargo, se ha descrito otro tipo de control, denominado *control positivo*. En el control positivo, una proteína reguladora *promueve* la unión de la RNA polimerasa, de manera que se incrementa la síntesis de mRNA. Consideraremos ahora un sistema que implica regulación positiva: la regulación del catabolismo de la maltosa en *Escherichia coli*.

El regulón maltosa

Las enzimas para la utilización de la maltosa en *Escherichia coli* se sintetizan después de la adición de este azúcar al medio de cultivo. El modelo de inducción de estas enzimas sigue el mostrado para la β-galactosidasa en la Figura 8.11, pero en este caso es la maltosa, en lugar de la lactosa, la que actúa como inductor. La síntesis de las enzimas para la utilización de la maltosa se controla a nivel de transcripción, pero por una **proteína activadora**, no por un represor. La *proteína implicada en la activación mediada por maltosa* no puede unirse al DNA a menos que se una primero la maltosa, que es el efector. Cuando la proteína activadora se une al DNA, permite a la RNA polimerasa comenzar la transcripción (Figura 8.14). Los activadores, como los represores, reconocen secuencias específicas en el DNA. La secuencia que sirve de sitio de unión del activador no se denomina operador, sino *sitio de unión del activador*. A pesar de ello, los genes controlados por estos sitios se llaman también operones.

En el control negativo, el represor se une al operador y bloquea la transcripción ¿Cómo funciona una proteína activadora? Los promotores controlados positivamente tienen secuencias nucleotídicas que no son reproducciones exactas de la secuencia consenso (*véase* Figura 7.27). Incluso con el factor sigma correcto, la RNA polimerasa tiene dificultades en reconocer estos promotores. La proteína activadora, cuando está unida al DNA, ayuda a la RNA polimerasa a reconocer al promotor o a comenzar la transcripción. La proteína activadora puede causar un cambio en la estructura del DNA, quizá curvándolo (Fi-

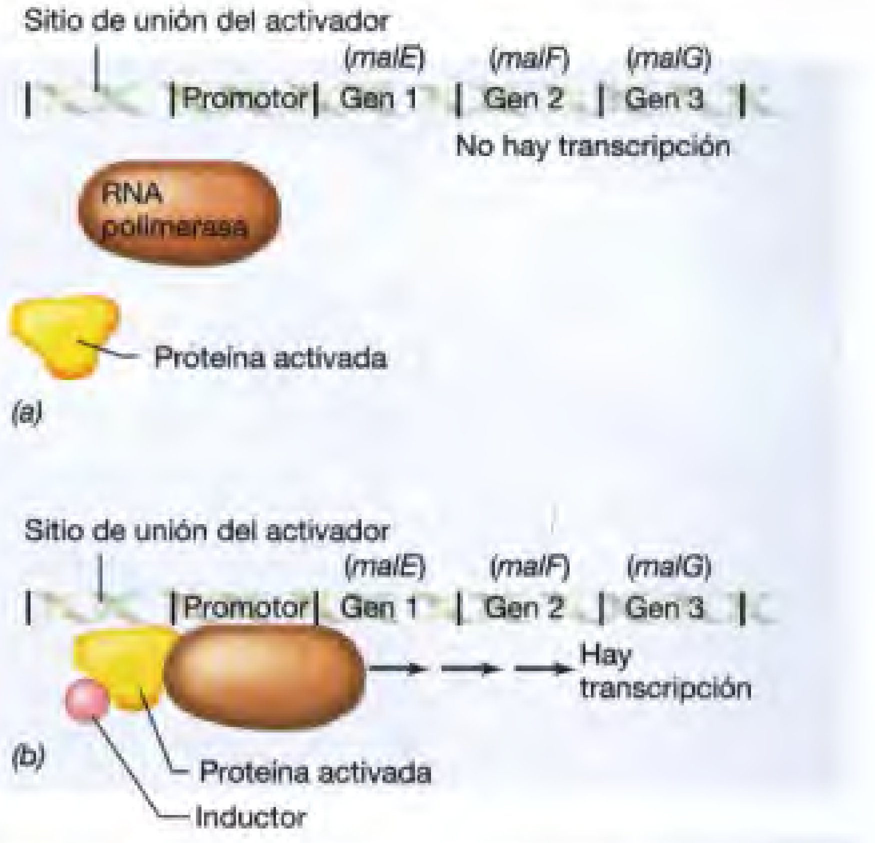

Sitio de unión del activador
Promotor
(malE) Gen 1
(malF) Gen 2
(malG) Gen 3
No hay transcripción
RNA polimerasa
Proteína activada
(a)
Sitio de unión del activador
Promotor
(malE) Gen 1
(malF) Gen 2
(malG) Gen 3
Hay transcripción
(b)
Proteína activada
Inductor

Figura 8.14 Control positivo de la inducción enzimática. (a) En ausencia de un inductor, ni la proteína activadora ni la RNA polimerasa pueden unirse al DNA. (b) Una molécula inductora se une a la proteína activadora, que a su vez se une al sitio de unión del activador. Esto permite a la RNA polimerasa unirse al promotor y comenzar la transcripción. En el caso del operón *malEFG*, la proteína activadora sería la proteína activadora de maltosa y el inductor sería la maltosa.

gura 8.15), permitiendo a la RNA polimerasa contactar apropiadamente con el DNA. La proteína activadora puede también interactuar directamente con la RNA polimerasa. Este hecho puede producirse cuando el sitio de unión del activador está cerca del promotor (Figura 8.16*a*) o cuando está cientos de pares de bases más lejos (Figura 8.16*b*).

Los genes necesarios para la utilización de la maltosa están repartidos en varios operones, cada uno de los cuales posee un sitio activador al que puede unirse la proteína activada por maltosa. Cuando hay más de un operón regulado por una sola proteína reguladora, se dice que estamos en presencia de un **regulón**. Por tanto, las enzimas para la utilización de la maltosa están codificadas por el *regulón maltosa*. También se conocen regulones para operones con control negativo. Las enzimas para la biosíntesis de arginina (*véase* Sección 8.5) son codificadas por el *regulón arginina*, cuyos operones están todos bajo el control de la misma proteína represora. Uno de estos operones se mostró en la Figura 8.12.

Muchos genes de *Escherichia coli* poseen promotores bajo control positivo, y muchos otros promotores están bajo control negativo. Sin embargo, se conocen otros tipos de regulación. Además, muchos genes (quizá la mayoría de ellos) o bien tienen un promotor con múltiples tipos de control o tienen más de un promotor, ¡cada uno con su propio sistema de control! En muchos casos existen niveles de control, estando la expresión génica regulada tanto por efectores específicos relacionados con la función de un gen particular (tal como el regulón de la maltosa que responde a maltosa), como por efectores más generales que responden a aspectos más globales del metabolismo. En realidad, tanto el operón lactosa como el regulón de la maltosa responden a tal sistema regulador global. Discutiremos este sistema en la sección siguiente.

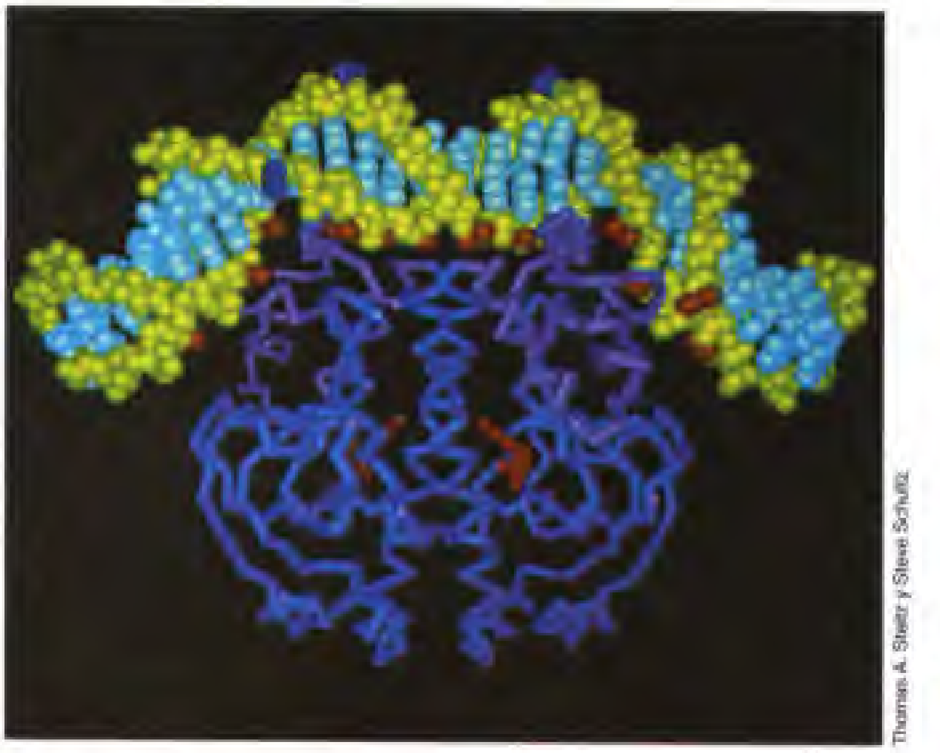

Thomas A. Steitz y Steve Schultz

Figura 8.15 Modelo computerizado de la interacción de una proteína reguladora positiva con el DNA. Esta figura muestra la proteína que une AMP cíclico, una proteína reguladora implicada en el control de varios operones. El esqueleto de carbonos de esta proteína se muestra en azul y púrpura. La proteína está unida a la doble hélice del DNA, que se muestra en amarillo y azul claro. Nótese que la unión de esta proteína al DNA ha producido en éste una curvatura de casi 90°. Reproducido con permiso de S. Schultz, G. Shields y T. Steitz, 1991. *Science 253:* 1001–1007. © 1991, AAAS.

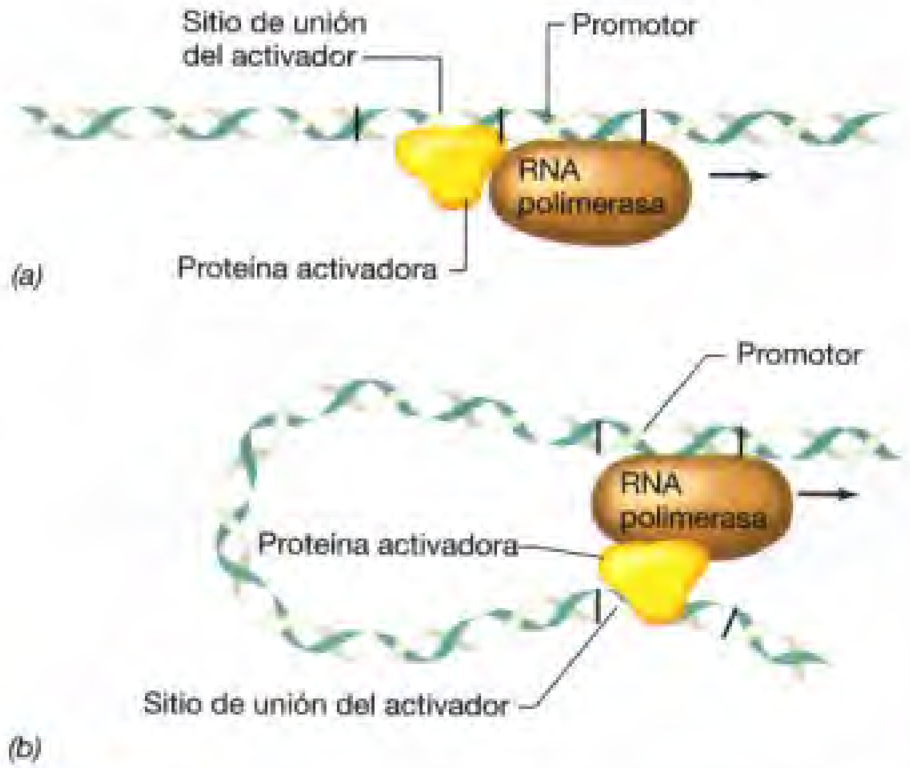


Figura 8.16 Algunas proteínas activadoras interaccionan con la RNA polimerasa. (a) El sitio de unión del activador está cerca del promotor. (b) El sitio de unión del activador está a varios cientos de pares de bases del promotor. En este caso, el DNA debe doblarse para permitir el contacto entre el activador y la RNA polimerasa.

✓ 8.6 Revisión de conceptos

Los reguladores positivos se llaman proteínas activadoras. Se unen a sitios de unión en el DNA y estimulan la transcripción de la RNA polimerasa. La actividad de la proteína activadora, como la de la proteína represora, se ve modificada por la acción de efectores. Para el control positivo de la inducción enzimática, el efector promueve la unión de la proteína activadora y estimula la síntesis de mRNA.

- ✓ Compare y contraste las actividades de una proteína activadora y una represora.
- ✓ Distinga entre un *operón* y un *regulón*.

8.7 Control global y el operón *lac*

A menudo, un organismo necesita regular muchos genes diferentes en respuesta a un cambio en el medio ambiente. Los mecanismos reguladores que responden a señales ambientales mediante la regulación de la expresión de muchos genes se denominan *sistemas de control global*.

Nuestras discusiones anteriores (Secciones 8.5 y 8.6) no consideraban la posibilidad de que el ambiente en el que se encontraban las células podía contener varias fuentes de carbono que la bacteria podía utilizar. Muchas bacterias, tal como *Escherichia coli*, pueden utilizar una amplia variedad de fuentes de carbono.

Sería un despilfarro inducir enzimas del metabolismo de la lactosa o maltosa si las células están ya creciendo en una fuente de carbono que pueden utilizar más eficientemente. De hecho, una de las redes reguladoras globales, la represión catabólica, evita estos problemas.

Represión catabólica

En la represión catabólica está inhibida la síntesis de una gran variedad de enzimas no relacionadas, principalmente catabólicas, cuando las células crecen en un medio que contiene una fuente preferida de energía, tal como la glucosa. La represión catabólica se conoce también como **efecto glucosa** ya que este azúcar fue la primera sustancia con la que se demostró, aunque en algunos organismos esta forma de represión enzimática está causada por otras fuentes de carbono. La represión catabólica asegura que el organismo utiliza en primer lugar la fuente de carbono y energía más fácilmente asimilable, tal como la glucosa.

Una consecuencia de la represión catabólica es que puede conducir al *crecimiento diaúxico* cuando las dos fuentes de energía están presentes simultáneamente en el medio y la enzima necesaria para la utilización de una de ellas está sujeta a represión catabólica. En el **crecimiento diaúxico**, el organismo crece primero sobre una fuente de energía, habiendo luego un corto lapso de tiempo antes de que el crecimiento se reasuma utilizando la segunda fuente de energía. Este fenómeno se ilustra en la Figura 8.17 para un crecimiento en una mezcla de glucosa y lactosa. La enzima β-galactosidasa, que es responsable de la utilización de la lactosa, es inducible, pero, a la vez, su síntesis está sujeta a represión catabólica. Así, en tanto en cuanto exista glucosa en el medio, la β-galactosidasa no se sintetiza; el organismo crece en glucosa y no utiliza la lactosa. Cuando se agota la glucosa, termina la represión catabólica. Después de un periodo de latencia se sintetiza la β-galactosidasa y se inicia el crecimiento en lactosa. Nótese en la Figura 8.17, que las células crecen más rápidamente en glucosa. Por tanto, la represión catabólica asegura que las células utilicen la *mejor* fuente de carbono primero.

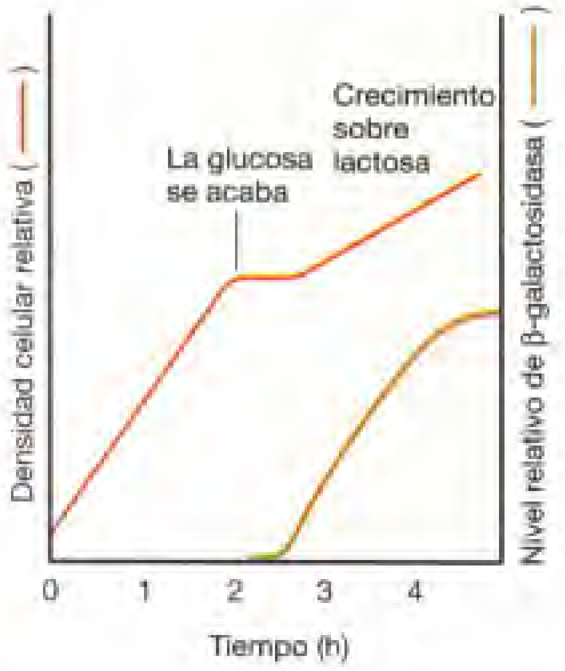


Figura 8.17 Crecimiento diáuxico en una mezcla de glucosa y lactosa. La glucosa reprime la síntesis de β-galactosidasa. Cuando se agota la glucosa, se produce un periodo de latencia hasta que se sintetiza la β-galactosidasa, y entonces puede reanudarse el crecimiento en lactosa, aunque a menor velocidad.

¿Cómo funciona la represión catabólica? La represión por catabolito implica el control transcripcional por una proteína activadora (*véase* Sección 8.6) y es, por tanto, un tipo de control positivo. En el caso de enzimas reprimibles por catabolito, la unión de la RNA polimerasa al DNA sólo tiene lugar si se une primero otra proteína denominada **proteína activada por catabolito (CAP)**. Como proteína alostérica, CAP se une al DNA sólo si ha unido primero una pequeña molécula llamada *adenosín monofosfato cíclico* o **AMP cíclico** (*véase* Figura 8.15). Por este motivo algunos científicos se refieren a esta proteína como *proteína receptora de cAMP* (*CRP*). El AMP cíclico (Figura 8.18) es un elemento clave de control, no sólo en bacterias sino también en eucariotas. El AMP cíclico se sintetiza a partir de ATP por una enzima llamada *adenilato ciclasa*. Altos niveles intracelulares de glucosa (*véase* Figura 4.26) inhiben la síntesis de AMP cíclico y estimulan su transporte al exterior. Así, cuando la glucosa se transporta dentro de la célula, el nivel de AMP cíclico baja, y no tiene lugar la unión de la RNA polimerasa al promotor. Por tanto, la represión por catabolito es en realidad el resultado de una carencia de AMP cíclico y puede subsanarse por simple adición de este nucleótido al medio de cultivo.

Aunque pueda parecer un sistema regulador positivo simple (Figura 8.14), cada uno de los operones controlados por CAP *también* está bajo el control de una proteína reguladora específica. Por tanto, la represión por catabolito modula varios sistemas reguladores no relacionados y, en consecuencia, es un buen ejemplo de control global. En presencia de glucosa, la represión por catabolito previene la expresión del resto de operones catabólicos que están bajo este elemento controlador global. La Figura 8.19 muestra la región reguladora completa del operón lactosa (operón *lac*). Para que la transcripción tenga lugar, deben cumplirse dos requerimientos: (1) el nivel de AMP cíclico debe ser suficientemente alto de modo que CAP se una a su sitio (control positivo) y (2) debe haber un inductor tal como la lactosa para que el represor no bloquee la transcripción por unión al operador (control negativo).

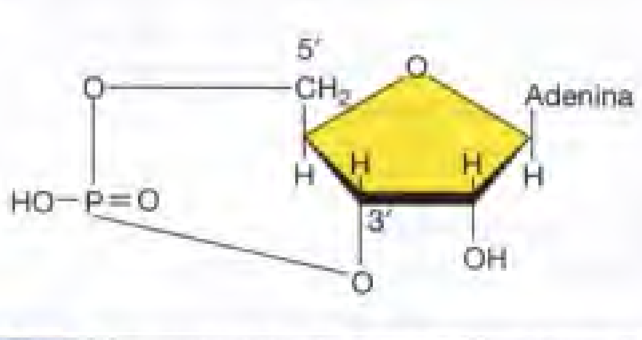


Figura 8.18 El monofosfato de adenosina cíclico (AMP cíclico, cAMP) se produce a partir de ATP por la enzima adenilato ciclasa.

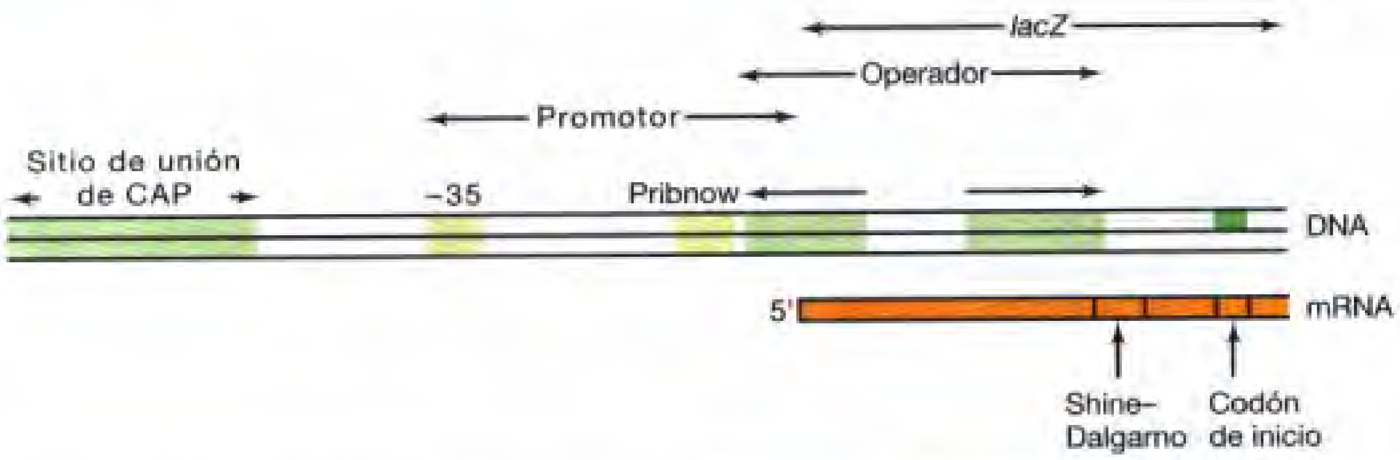


Figura 8.19 Elementos genéticos implicados en la regulación del operón lactosa. El primer gen de este operón, *lacZ*, codifica la enzima β-galactosidasa, que hidroliza la lactosa (*véase* Figura 8.13). El operón contiene otros dos genes que también están implicados en el metabolismo de la lactosa. Esta figura muestra la región que controla este operón. Las dos mitades del operador (donde se uniría el represor) son repeticiones invertidas casi perfectas. También existen repeticiones invertidas en el sitio de unión de CAP aunque son menos perfectas. El sitio del inicio de la transcripción estaría localizado en el DNA exactamente en el extremo 5'del mRNA. La localización de la secuencia −35 y de la caja Pribnow, que son parte del promotor (*véase* Figura 7.27), se muestran también. Finalmente, se presentan la localización de los pares de bases que codifican la secuencia Shine-Dalgarno y el codón de iniciación. Estas dos últimas secuencias son funcionales en el mRNA (*véase* Sección 7.13).

✓ 8.7 Revisión de conceptos

Los sistemas de control global responden a señales del ambiente y regulan la expresión de muchos genes simultáneamente. La represión catabólica es un sistema de control global, y sirve para ayudar a las células a hacer un uso más eficiente de las fuentes de carbono. El operón *lac* está bajo el control de la represión catabólica así como bajo su propio sistema regulador.

- ✓ Explique cómo la represión catabólica puede implicar una proteína activadora.
- ✓ Explique cómo el operón *lac* es regulado positiva y negativamente.

IV REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN: OTROS MECANISMOS

Hemos descrito unos cuantos mecanismos fundamentales utilizados por las células para regular la transcripción de sus genes. Los represores pueden utilizarse para inhibir la transcripción en los sistemas de control negativo, y las proteínas activadoras pueden activar la transcripción en los sistemas de control positivos. Hemos visto también que existe más de un nivel de control en la regulación de la expresión de genes específicos. En las siguientes secciones discutiremos otros mecanismos utilizados por las células para regular la transcripción.

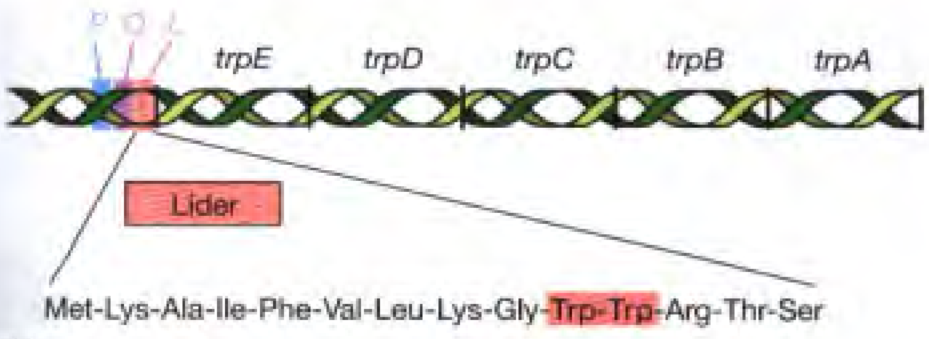
8.8 Atenuación

Algunos sistemas de regulación no implican proteínas reguladoras que se unen al DNA. Un proceso regulador de este tipo se llama **atenuación**. La palabra *atenuación* significa disminuir la cantidad. Previamente, hemos descrito la regulación de la transcripción en la *iniciación;* esto es, represores que bloquean la síntesis de RNA y proteínas activadoras que la favorecen. En la atenuación de la transcripción, el control tiene lugar *después* de la iniciación de la síntesis de RNA pero antes de su terminación. Esto es, el número de transcritos *completos* de un gen o de un operón se reduce, aunque el número de los iniciados no lo hace. La mayoría de los primeros ejemplos de atenuación conocidos implican la regulación de genes que controlan la biosíntesis de aminoácidos en *Bacteria* Gramnegativas. El primero de estos sistemas en describirse fue el *operón triptófano* en *Escherichia coli*, y en él nos centraremos.

Atenuación y el operón triptófano

El operón triptófano contiene genes estructurales para cinco proteínas de la ruta biosintética del triptófano, además del promotor y secuencias reguladoras al comienzo del operón (Figura 8.20). Como muchos operones, el operón triptófano tiene más de un tipo de regulación. La primera enzima de la ruta, antranilato sintetasa (una enzima multiproteica codificada por *trpD* y *trpE*) está sometida a retroinhibición por triptófano (*véase* Sección 8.2). Además, la transcripción del operón está bajo el control de un represor, y una de las secuencias reguladoras es un operador al que puede unirse el represor del triptófano.

Además de las regiones del promotor (P) y del operador (O), existe una secuencia denominada **secuencia líder**, que codifica un polipéptido que contiene repeticiones en pareja de codones para triptófano cerca de su inicio y funciona como un **atenuador** (Figura 8.20). Si la célula tiene mucho triptófano, se sintetiza péptido líder; por el contrario, si el suministro es escaso *no* se sintetiza. El aspecto sorprendente es que la síntesis del péptido líder da lugar a la *terminación* de la transcripción del resto del operón, que incluye los genes estructurales para la síntesis de las


P O L
trpE
trpD
trpC
trpB
trpA
Líder
Met-Lys-Ala-Ile-Phe-Val-Leu-Lys-Gly-Trp-Trp-Arg-Thr-Ser

(a)

Treonina	Met-Lys-Arg-Ile-Ser-Thr-Thr-Ile-Thr-Thr-Thr-Ile-Thr-Ile-Thr-Thr-Gly-Asn-Gly-Ala-Gly
Histidina	Met-Thr-Arg-Val-Gln-Phe-Lys-His-His-His-His-His-His-His-Pro-Asp
Fenilalanina	Met-Lys-His-Ile-Pro-Phe-Phe-Phe-Ala-Phe-Phe-Phe-Thr-Phe-Pro

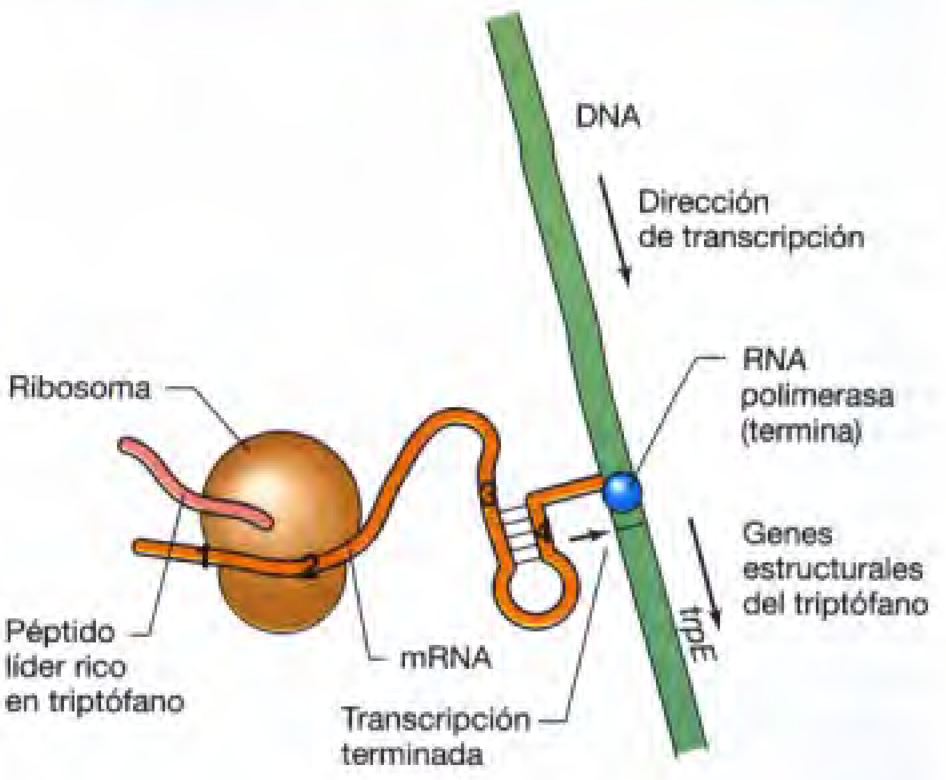
(b)

Figura 8.20 La estructura del operón y líder del triptófano y de otros péptidos líderes en *Escherichia coli*. (a) Organización del operón del triptófano. Nótese que el líder (L) codifica para un péptido corto que contiene dos residuos de triptófano cerca de su extremo (hay un codón de parada tras el codón de Ser). El promotor se indica con P y el operador con O. Los genes indicados, de *trpE* a *trpA*, codifican las enzimas implicadas en la biosíntesis de triptófano. (b) Secuencia de aminoácidos de otros péptidos líderes sintetizados en otros operones biosintéticos. Dado que la isoleucina se sintetiza a partir de la treonina es un componente importante del péptido líder de la treonina.

enzimas biosintéticas. Si la síntesis del péptido se bloquea debido a la deficiencia en triptófano, entonces tiene lugar la transcripción de cada uno de los genes del operón.

¿Cómo puede la *traducción* de un péptido líder regular la *transcripción* del resto de los genes del triptófano? Esto puede explicarse si consideramos que ambos procesos ocurren simultáneamente en procariotas (Figura 8.21). Así, mientras está teniendo lugar la *transcripción* de las secuencias de DNA distales, ya ha comenzado la *traducción* de los transcritos proximales. Esto se debe a que a medida que el RNA se separa del DNA, se unen los ribosomas y comienza la traducción. La atenuación (parada de la transcripción) ocurre porque una parte del RNA recién sintetizado se pliega formando una lazo bicatenario seguido por una secuencia de uracilos, es decir, se forma una señal de parada para la RNA polimerasa (*véase* Figura 7.28). Las estructuras de bucles con tallo formadas por el mRNA tiene lugar por la existencia de secuencias nucleotídicas cercanas que son complementarias entre sí y permiten el apareamiento de bases. Si hay abundancia de triptófano, los ribosomas traducirán la secuencia líder hasta llegar al codón de parada. El resto del RNA líder puede adquirir entonces una estructura en bucle o *sitio de pausa de la transcripción*, seguida de la secuencia rica en uracilo que es la que causa la terminación. Sin embargo, si el triptófano escasea, el ribosoma se detiene en un codón de triptófano; la presencia del ribosoma detenido per-

Exceso de triptófano: se termina la transcripción


DNA
Dirección de transcripción
RNA polimerasa (termina)
Ribosoma
Genes estructurales del triptófano
trpE
1
2
3
4
Péptido líder rico en triptófano
mRNA
Transcripción terminada

Carencia de triptófano: la transcripción no se detiene

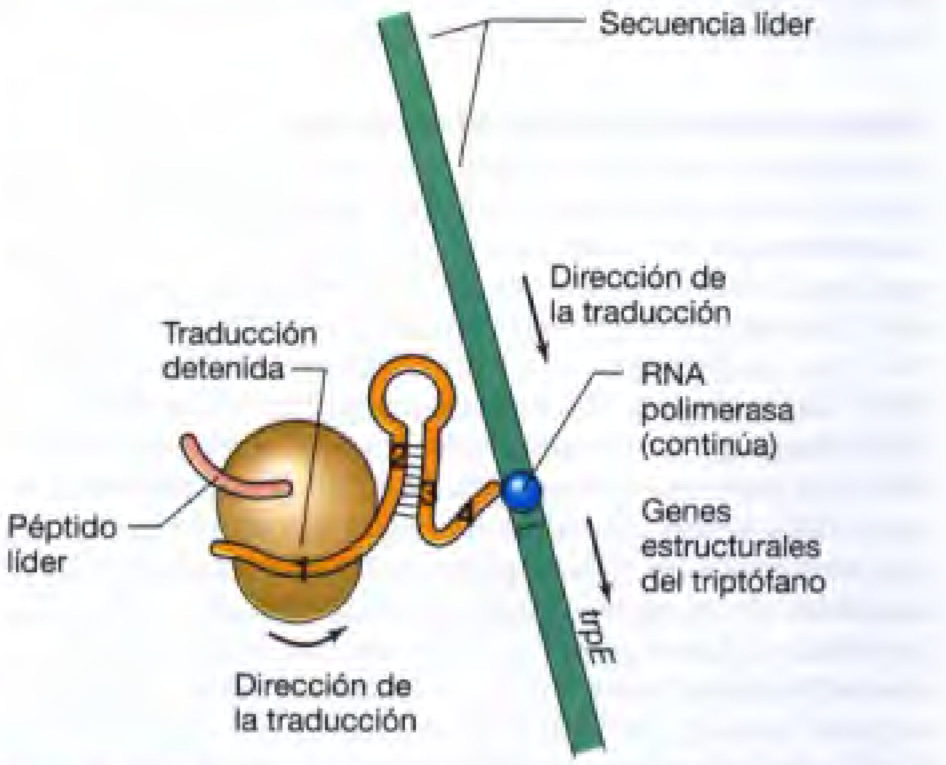

Secuencia líder
Dirección de la traducción
Traducción detenida
RNA polimerasa (continúa)
Genes estructurales del triptófano
Péptido líder
1
2
3
4
trpE
Dirección de la traducción

Figura 8.21 Control de la transcripción de los genes estructurales del operón triptófano por atenuación en *Escherichia coli*. El péptido líder es codificado por las regiones 1 y 2 del mRNA. Dos regiones del mRNA naciente son capaces de formar estructuras en forma de bucle, 2:3 y 3:3. En exceso de triptófano, el ribosoma traduce el péptido líder completo, y así la región 2 no puede aparearse con la región 3. Entonces, las regiones 3 y 4 se aparean y forman un bucle que determina la parada de la RNA. Si la traducción se bloquea por falta de triptófano, se forma un bucle a través del apareamiento 2:3, no se forma un bucle 3:4, y la transcripción continúa pasado el péptido líder.

mite, a su vez, la formación de un bucle alternativo (sitios 2 y 3 en la Figura 8.21). Este bucle *no* es una señal de terminación, y, efectivamente, impide que se forme el terminador (sitios 3 y 4 en la Figura 8.21). La RNA polimerasa pasa por la región no plegada y comienza la transcripción de los genes estructurales. Así pues, vemos cómo la atenuación es un sistema altamente integrado en el que la transcripción y la traducción interaccionan, estando la velocidad de transcripción influenciada por la velocidad de traducción.

En el operón triptófano, existen dos mecanismos distintos de regulación de la transcripción: la represión y la atenuación. La represión es un mecanismo que tiene efectos drásticos en la velocidad de síntesis de enzimas, mientras que la atenuación representa un control más fino. Trabajando juntos, ambos mecanismos regulan con precisión la síntesis de las enzimas biosintéticas del triptófano, y, por tanto, la biosíntesis del aminoácido. En *Escherichia coli* también se ha observado atenuación en las rutas biosintéticas de la histidina, treonina-isoleucina, fenilalanina y otros aminoácidos y metabolitos esenciales. Como se muestra en la Figura 8.20*b*, el péptido líder que controla el operón biosintético de cada aminoácido es rico en ese aminoácido particular. El operón *his* es dramático a este respecto, ya que su líder contiene *siete* histidinas seguidas hacia el final del péptido (Figura 8.20*b*). Este segmento más largo de codones reguladores confiere un mayor efecto a la atenuación, que podría compensar la ausencia de control negativo en el operón *his*.

Otros mecanismos de atenuación

Las *Bacteria* Gram positivas, como *Bacillus*, también utilizan la atenuación para regular ciertos operones de la biosíntesis de aminoácidos. Como en *Bacteria* Gram negativas, los mecanismos también implican atenuación de la transcripción y estructuras secundarias alternativas, que en determinada configuración causan terminación. Sin embargo, los mecanismos son independientes de la traducción, y utilizan, en lugar del ribosoma activo, una proteína que se une al RNA. Esta proteína se une como resultado de su interacción con un *efector*, en algunos casos un tRNA, pero en otros es el mismo aminoácido. En el operón triptófano de *Bacillus subtilis* la proteína se llama *proteína trp de atenuación*, y en presencia del aminoácido triptófano se une al líder y favorece la terminación de la transcripción. Si el triptófano es limitante, la proteína no se une y la transcripción tiene lugar.

Se conocen muchos casos en los que la atenuación implica genes no relacionados con la biosíntesis de aminoácidos, y, obviamente, el mecanismo no implica la evaluación de la cantidad de aminoácido. En *Escherichia coli* algunos de los operones implicados en la biosíntesis de pirimidinas están regulados por atenuación, y ocurre lo mismo con los genes de la biosíntesis de pirimidinas en *Bacillus*. Los mecanismos son, sin embargo, bastante diferentes. En *E. coli* está implicado el RNA líder, pero en *Bacillus* no existe acoplamiento entre la transcripción y la traducción. En su lugar, una proteína que une RNA controla las estructuras alternativas del mRNA.

Finalmente, se conoce un tipo de regulación denominada *atenuación traduccional*. En estos casos, la traducción del péptido líder previene la *traducción* del gen siguiente en el mRNA policistrónico. El mecanismo implica aparentemente la accesibilidad de la secuencia Shine-Dalgarno del gen regulado (*véase* Sección 7.15). La atenuación traduccional regula también la expresión de varios genes de resistencia a antibióticos en *Bacteria* Gram positivas.

✓ 8.8 *Revisión de conceptos*

La atenuación es un mecanismo en el que la expresión génica (típicamente a nivel de la transcripción) se controla *después* de la iniciación de la síntesis de RNA. La mayoría de los mecanismos de atenuación implican un acoplamiento de la transcripción y la traducción, y pueden, por tanto, producirse solamente en procariotas.

- ✓ ¿Por qué los sistemas de control que implican acoplamiento de transcripción y traducción sólo tienen lugar en *procariotas*?
- ✓ Explique cómo la formación de una estructura cruciforme en el RNA puede bloquear la formación de otra.

8.9 Otras redes de control global

En la Sección 8.6, discutimos el hecho de que los organismos tienen *sistemas de control global* que regulan muchos genes simultáneamente en respuesta a una señal ambiental específica. En esa sección discutimos la represión catabólica en *Escherichia coli*. Sin embargo, existen varios sistemas de control global diferentes; en la Tabla 8.1 se muestran algunos de los descritos en *E. coli*.

Los sistemas de control global incluyen frecuentemente más de un regulón (*véase* Sección 8.7). Algunas veces, el término *modulón* se utiliza para describir un grupo de genes que pueden responder a una proteína reguladora común incluso cuando son miembros de diferentes regulones (y, en consecuencia, tienen al menos otro tipo de control). A veces, el término *estimulón* se utiliza a veces para describir un grupo de genes que responden a la misma señal ambiental. Tal grupo de genes puede ser muy grande y las vías reguladoras muy complejas. La realidad es que muchos genes obedecen a más de un sistema de control global.

Factores sigma alternativos

Los genes que pertenecen a sistemas de control global no usan una simple combinación de represores y activadores para llevar a cabo la regulación. Varios de ellos implican *factores sigma alternativos*, algunos de los cuales se muestran en la Tabla 8.1, y en estos casos, la regulación se produce por cambios en la cantidad o en la actividad de estos factores.

Recordemos que el factor sigma es la subunidad de la RNA polimerasa responsable del reconocimiento del promotor (*véase* Sección 7.8). La mayoría de los genes de *Es-*

TABLA 8.1 Algunos sistemas de control global en *Escherichia coli*[a]

Sistema	Señal	Actividad primaria de la proteína reguladora	Número de genes regulados
Respiración aeróbica	Presencia de oxígeno	Represor (ArcA)	50+
Respiración anaeróbica	Ausencia de oxígeno	Activador (FNR)	70+
Represión catabólica	Concentración de cAMP	Activador (CAP)	300+
Choque térmico	Temperatura	Sigma alternativo (σ^{32})	36
Utilización de nitrógeno	Limitación de NH_3	Activador (NR_I)/sigma alternativo (σ^{54})	12+
Estrés oxidativo	Agente oxidante	Activador (OxyR)	30+
Respuesta SOS	DNA dañado	Represor (LexA)	20+

[a] La regulación es compleja para muchos de los sistemas de control globales. Una única proteína reguladora puede tener más de una función. Por ejemplo, la proteína reguladora de la respiración aeróbica es un represor para muchos promotores, pero es un activador para otros; mientras que la proteína represora para la respiración anaeróbica es una proteína activadora para muchos promotores, pero es un represor para otros. La regulación también puede ser indirecta o requerir más de una proteína reguladora. Algunas de las proteínas reguladoras implicadas son miembros de sistemas de dos componentes (*véase* Sección 8.10). Muchos genes son regulados por más de un sistema global. (Para una explicación de la respuesta SOS, *véase* Sección 10.3.)

cherichia coli requieren el factor σ^{70} (el exponente 70 alude al tamaño de esta proteína de 70 kilodaltons) para su transcripción y poseen promotores como los mostrados en la Figura 7.27. Los genes que son inducidos por un incremento de temperatura tienen promotores con una secuencia bastante diferente y la RNA polimerasa requiere un factor sigma diferente (σ^{32}) para reconocerlos. Es la *cantidad* de este factor sigma alternativo lo que regula la *respuesta al choque térmico*, y la cantidad de la propia σ^{32} está controlada, no por la transcripción, sino por la estabilidad del factor, su velocidad de traducción y su actividad. En total, hay siete factores sigma diferentes en *E. coli* (Tabla 8.2). La mayoría de ellos tiene homólogos en otras *Bacteria*, como, por ejemplo, *Bacillus subtilis*. Sin embargo, *B. subtilis* tiene factores sigma alternativos para la formación de endosporas (*véase* Sección 4.15).

Respuesta al choque térmico

La mayoría de las proteínas son muy estables; una vez sintetizadas, continúan realizando su función y pasan a la otra célula en el proceso de división. Sin embargo, algunas proteínas son muy inestables. Son reconocidas por enzimas celulares llamadas **proteasas** y son degradadas rápidamente. En *E. coli*, σ^{32} es degradada en uno o dos minutos después de su síntesis. Sin embargo, cuando las células experimentan un choque térmico, este proceso de degradación es inhibido. Esto significa que habrá más abundancia de σ^{32}, las cuales dirigirán a más moléculas de RNA polimerasa a nuevos promotores dependientes del choque térmico. También existe un *control traduccional* de σ^{32} que implica secuencias en su mRNA, pero el mecanismo está poco claro.

TABLA 8.2 Factores sigma en *Escherichia coli*

Nombre[a]	Función
σ^{70}	Para la mayoría de los genes, principal factor durante el crecimento normal
σ^{54}	Asimilación de nitrógeno
σ^{38}	Principal factor durante la fase estacionaria, también para genes implicados en las respuestas oxidativa y osmótica
σ^{32}	Respuesta al calor
σ^{28}	Para genes implicados en la síntesis del flagelo
σ^{24}	Respuesta a proteínas mal plegadas en el periplasma (*véase* Sección 4.8)
σ^{19}	Para ciertos genes del transporte del hierro

[a] El exponente indica el tamaño de la proteína en kilodaltons. La mayoría de los factores tienen también otros nombres, *i.e.*, σ^{70} se denomina también σ^{D}.

Los sistemas de regulación global deben tener una vía común para transmitir una señal ambiental a los genes. Hemos visto cómo se consigue esto en la represión catabólica, pero en el caso de la respuesta al choque térmico, ¿cómo siente la bacteria la temperatura? El mecanismo parece implicar las *proteínas de choque térmico*, que incluyen una proteína llamada DnaK.

DnaK es esencial para el crecimiento normal de *E. coli* a cualquier temperatura, pero la cantidad que se sintetiza se incrementa tras un choque térmico (recordemos que los genes bajo el control de un sistema de control global son por lo general, también regulados de otras maneras). La proteína DnaK es una **chaperonina**, un grupo de proteínas denominadas *chaperonas moleculares* (*véase* Sección 7.16). DnaK ayuda a otras proteínas a plegarse apropiadamente y está también implicada en la degradación de σ^{32}. Es posible que cuando la temperatura aumenta, la actividad de DnaK se dirija más hacia el plegamiento de las proteínas que a una degradación de σ^{32}. (DnaK está también implicada en la inhibición de la *actividad* de σ^{32}.) Ciertamente, un aumento en la temperatura puede afectar a la formación de estructuras secundarias y terciarias correctas de las proteínas, o incluso desnaturalizarlas ligeramente (*véase* Sección 3.8). Esto daría lugar a en un incremento en el nivel de σ^{32}, de modo que serían transcritos los genes que codifican proteínas de choque térmico. Sin embargo, puesto que la cantidad de DnaK se incrementa como parte de la respuesta a choque térmico, su concentración aumenta y σ^{32} es degradado de nuevo, volviendo la célula a su estado original.

Quorum sensing

Los sistemas de control global permiten a un organismo responder efectivamente a señales de su ambiente. Una «señal» interesante es la presencia de otros organismos de la misma especie. Se ha descubierto que ciertas *Bacteria* tienen vías regulatorias que están controladas por la densidad de las células dentro de la propia población. Este tipo de control se denomina ***quorum sensing*** (percepción en *quorum*).

Cada bacteria Gram negativa con este tipo de regulación tiene una enzima que sintetiza una lactona de homoserina acilada (AHL) específica. Esta molécula puede difundir al exterior de la célula. Por tanto, sólo se pueden alcanzar altas concentraciones dentro de la célula si existe un gran número de células cercanas sintetizando la misma AHL. Estas moléculas AHL son el inductor que se combina con una proteína activadora. El *quorum sensing* se descubrió primeramente como una forma de regulación de la quimioluminiscencia en ciertas bacterias (*véanse* Sección 12.12 y Figura 12.28). La Figura 8.22 muestra colonias de la bacteria *Vibrio fischeri* que están brillando debido a la producción de la luciferasa bacteriana. Los operones *lux*, que codifican una proteína implicada en la bioluminiscencia, están bajo el control de la proteína activadora LuxR y son inducidos cuando la concentración de N-3-oxohexanoil homoserina lactona alcanza una concentración suficiente. Esta AHL es sintetizada por la proteína codificada por el gen *luxI*. Otros genes son también controlados por este sistema. En algunas bacterias, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, está claro que el *quorum sensing* es una respuesta global que conduce a la expresión de un gran número de genes diferentes cuando la densidad de población llega a ser suficientemente alta. Esto ayuda a la formación de películas (biofilms) por *P. aeruginosa* (*véase* Sección 19.3), un aspecto importante de su patogénesis.

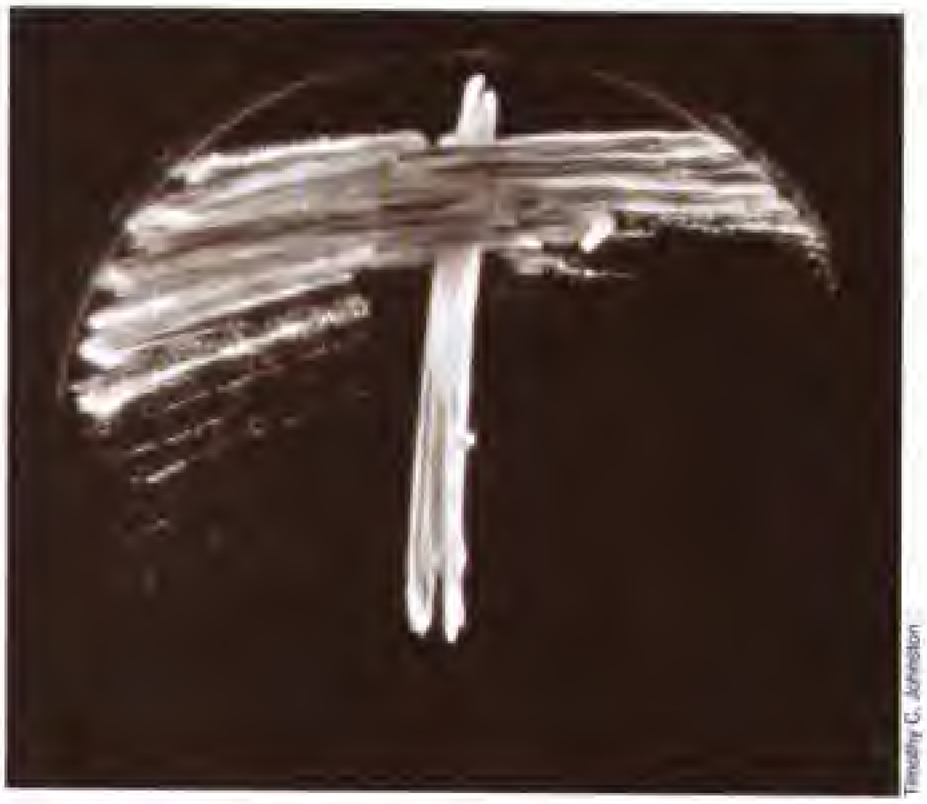

Timothy C. Johnston

Figura 8.22 Bacterias bioluminiscentes que están produciendo la enzima luciferasa. Células de la bacteria *Vibrio fischeri* se extendieron sobre agar nutritivo en una placa de Petri y se dejaron crecer durante la noche. La fotografía se tomó utilizando exclusivamente la luz generada por la bacteria.

La patogénesis de *Staphylococcus aureus* (*véanse* Secciones 25.7 y 26.9) implica la producción y secreción de numerosas proteínas, de superficie y extracelulares, que dañan las células o tejidos del huésped o que interfieren con el sistema inmune. Los genes que codifican estos factores de virulencia están bajo el control de un sistema *quorum* que responde a un péptido producido por el propio organismo. La regulación de estos genes es bastante compleja y, en parte, implica una *molécula de RNA reguladora*. Aunque en este capítulo hemos disertado solamente sobre proteínas reguladoras, también existen moléculas de RNA reguladoras (*véase* cuadro, Ácido nucleico antisentido). El sistema de *quorum sensing* de *S. aureus* también implica proteínas reguladoras que son parte de un sistema regulador de transducción de señales de dos componentes. Discutiremos este tipo de regulación en la siguiente sección.

✓ 8.9 Revisión de conceptos

Las células tienen muchos sistemas de control global diferentes que les permiten regular la expresión de muchos genes en respuesta a cambios en el ambiente. Estos cambios pueden incluir factores nutricionales, temperatura, e incluso el número de bacterias presentes. Algunos de estos sistemas reguladores implican factores sigma alternativos.

- ✓ ¿Qué es un *factor sigma alternativo*?
- ✓ ¿Qué significa «*quorum sensing*»?

8.10 Transducción de señales y sistemas reguladores de dos componentes

Las bacterias regulan el metabolismo celular en respuesta a una variedad de fluctuaciones ambientales, incluyendo cambios de temperatura, cambios en el pH y accesibilidad de oxígeno, cambios en la accesibilidad de nutrientes, e incluso cambios en el número de células presentes. Por tanto, deben existir mecanismos por los cuales las bacterias reciben las señales del ambiente y las transmiten a las dianas específicas que son objeto de regulación. Hemos visto en la sección precedente que algunas señales pueden ser pequeñas moléculas que entran en la célula (frecuentemente por mecanismos de transporte específico) y actúan como *efectores*. Por ejemplo, en el caso del regulón de la maltosa (*véase* Sección 8.6), la maltosa se une a su proteína activadora, permitiendo su unión a secuencias específicas del DNA y activar la transcripción. Sin embargo, en muchos casos la señal externa no es transmitida directamente a la proteína reguladora. En su lugar, la señal es detectada primeramente por un sensor y luego se transmite en una forma diferente al resto de la maquinaria reguladora, un proceso denominado **transducción de señales**.

Atención a... Ácido nucleico antisentido

La regulación de la síntesis de proteínas implica frecuentemente control transcripcional. Menos frecuentemente, los genes son controlados a nivel de traducción. La mayoría de las redes de control, sean transcripcionales o traduccionales, usan proteínas reguladoras. Se sabe, sin embargo, que en algunos casos, es un *RNA* regulador, en lugar de una *proteína* reguladora, el que está implicado.

Un tipo de RNA regulador, llamado **RNA antisentido**, se utiliza en la regulación de varios genes bacterianos diferentes. El RNA antisentido actúa formando pares de bases con una banda de DNA complementario, o RNA con sentido (Figura 1). Cuando el RNA con sentido es mRNA, la estructura bicatenaria resultante puede impedir la traducción. En algunos sistemas reguladores, este mRNA antisentido se sintetiza a partir de un gen muy pequeño cuya secuencia es esencialmente la misma que la del gen diana pero cuya transcripción ocurre en la dirección opuesta (*véase* Figura 1). Si se sintetiza este RNA antisentido puede aparearse con el mRNA e impedir la traducción. Nótese que también puede regularse la síntesis o la estabilidad de este RNA antisentido.

El RNA antisentido no tiene por qué ser solamente utilizado para regular la síntesis de una proteína. En algunos plásmidos, controla la iniciación de la síntesis de DNA. En eucariotas existe también un fenómeno denominado «silenciamiento de RNA» en el cual pequeñas moléculas de RNA bicatenario aparentemente marcan ciertos mRNAs para una destrucción rápida. (Aunque, incluso en eucariotas, el mRNA es menos estable que el rRNA o el tRNA, es en general más estable que el mRNA de procariotas.)

Los ácidos nucleicos antisentido pueden ser diseñados y sintetizados por los investigadores en el laboratorio y suministrados directamente a las células. Estas cortas (15-25 nucleótidos) cadenas sintéticas (oligonucleótidos) se sintetizan preferentemente como DNA, en lugar de RNA. Su secuencia puede diseñarse de tal manera que se aparee con un mRNA específico e impida su traducción (o permita a la molécula ser reconocida por nucleasas específicas). El ácido nucleico antisentido puede unirse también al DNA en el núcleo e impedir la transcripción. ¡Esto último es posible porque algunos DNA pueden formar una *triple* hélice! La banda «extra» (el oligonucleótido) forma interacciones específicas con las zonas de las bases que están en el surco principal de la doble hélice para originar el **DNA triple**. (No todas las secuencias de DNA pueden formar hélices triples, al menos sin la ayuda de enzimas especiales.)

Se pueden diseñar oligonucleótidos sintéticos antisentido muy específicos, con independencia de que se unan a un mensaje o a la región reguladora de un gen. La especificidad surge porque una secuencia de tan sólo 20 bases no debe producirse más de una vez cada 10^{12} bases en un DNA «aleatorio». Así, es altamente improbable que se una a otra diana que no sea la suya. Esta especificidad puede permitir a los ácidos nucleicos antisentido convertirse en una nueva clase de antibióticos importante. Podrían diseñarse ácidos nucleicos antisentido contra virus específicos o para regular genes particulares en organismos causantes de enfermedades (patógenos) o células tumorales humanas. ■

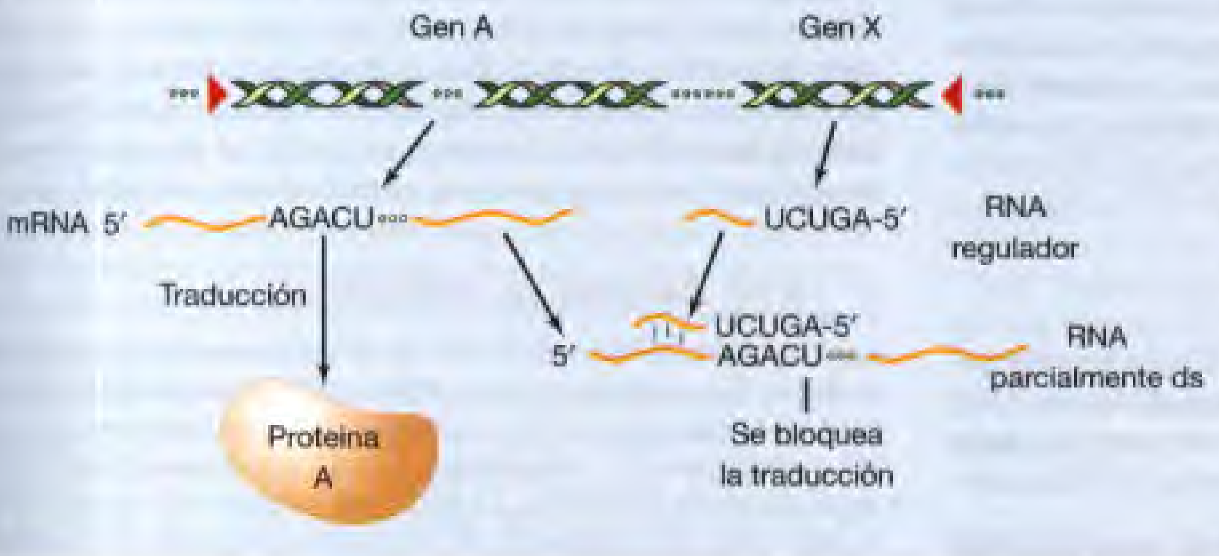


Figura 1 **El gen A se transcribe desde su promotor (*véase* Sección 7.9) para dar un mRNA que puede ser transcrito para originar la proteína A. El gen X es un pequeño gen cuya secuencia es idéntica a la del gen A, pero su promotor está en el extremo opuesto. Así, si es transcrito, el RNA resultante será complementario al mRNA del gen A. Si ambos RNAs se aparean, se bloqueará la transcripción.**

Quinasas detectoras y reguladores de respuesta

Muchos de los sistemas reguladores por los que las células sienten y responden a señales ambientales se denominan **sistemas de dos componentes**. De manera general, tales sistemas incluyen dos proteínas diferentes: (1) una **proteína detectora** específica localizada en la membrana, y (2) una **proteína reguladora de respuesta**. La *proteína detectora* tiene actividad *quinasa* y se conoce usualmente como **quinasa detectora**. Una quinasa es una enzima que fosforila compuestos. Las quinasas sensoras detectan una señal ambiental en su superficie externa y en respuesta se fosforilan a sí mismas (autofosforilan) en un residuo específico de histidina presente en la parte citoplásmica de la molécula (*véase* Figura 8.23). Este grupo fosforilo se transmite entonces a otra proteína intracelular, el *regulador de respuesta*. El regulador de respuesta es típicamente una proteína que se une al DNA y regula la transcripción.

En la Figura 8.23, el regulador de respuesta fosforilado está actuando como una proteína represora, mientras que

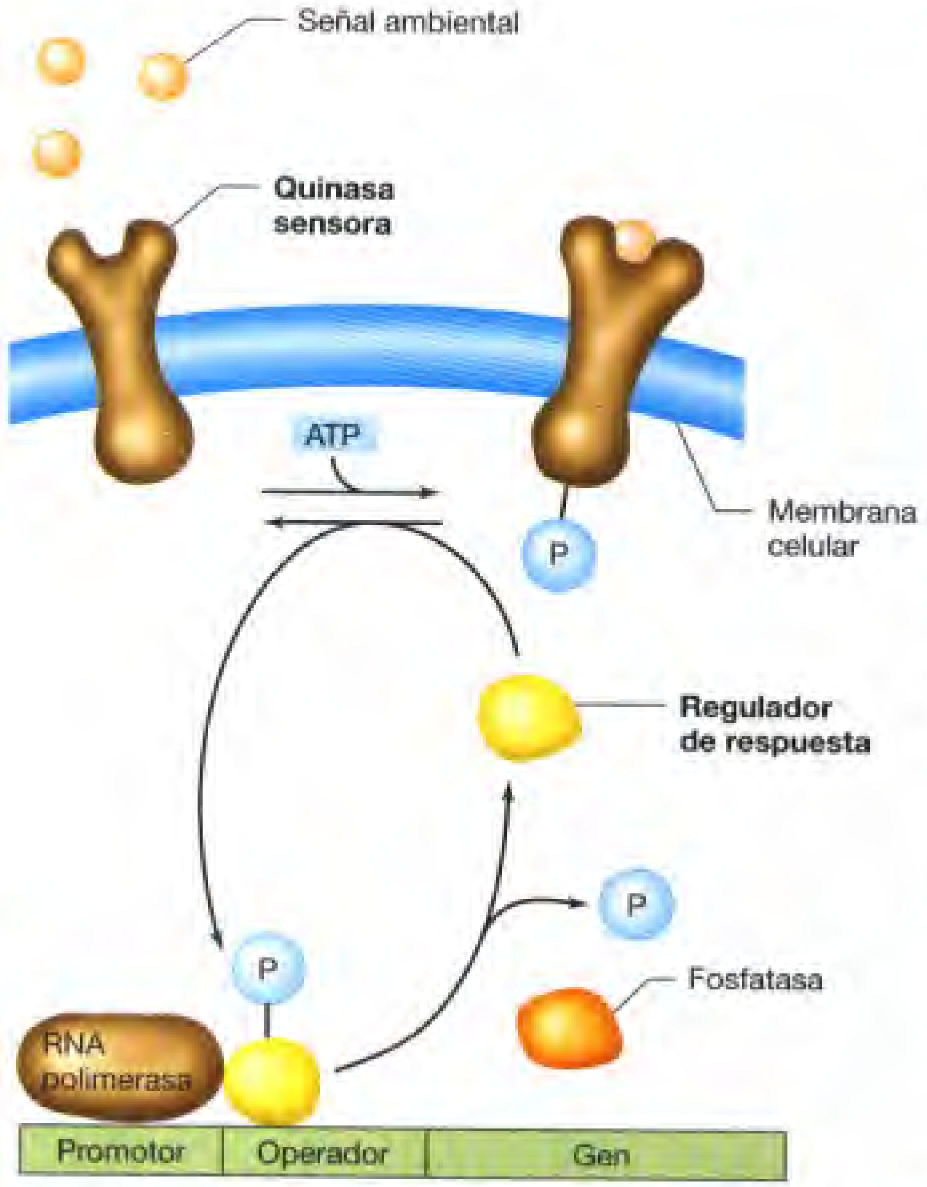


Figura 8.23 Control de la expresión génica en un sistema de dos componentes. Los principales componentes incluyen una *quinasa sensora* en la membrana citoplasmática que se autofosforila en respuesta a una señal del medio. El grupo fosforilo es entonces transmitido al otro componente importante, un *regulador de respuesta*. En el sistema representado en la figura, el regulador fosforilado de la respuesta actúa como un represor. Debe existir una fosfatasa en el sistema que recicle el regulador de respuesta.

en su estado no fosforilado no se une al DNA. Frecuentemente, sin embargo, el regulador de respuesta fosforilado actúa como una proteína activadora. El mecanismo usado por el regulador de respuesta para controlar la transcripción depende de cada sistema.

A fin de completar el circuito regulador, debe existir una manera de terminar la señalización. Esta etapa implica típicamente una *fosfatasa*, enzima que puede liberar el grupo fosforilo del regulador de respuesta. En algunos casos, esta reacción es efectuada por el propio regulador de respuesta, mientras que en otros existe una tercera proteína que realiza esta reacción. Por tanto, ¡existen sistemas de «dos componentes» con tres componentes! En realidad, algunos sistemas tienen incluso más componentes, ya que la señal puede ser procesada a través de varias etapas. Sin embargo, en todos los casos, los sistemas de dos componentes tienen una quinasa sensora y un regulador de respuesta.

Ejemplos de sistemas reguladores de dos componentes

Se sabe que los sistemas de dos componentes regulan un gran número de genes en muchas bacterias diferentes. Algunos ejemplos incluyen la asimilación de fosfato en *Escherichia coli*, la fijación de nitrógeno en *Klebsiella* y *Rhizobium*, y la esporulación en *Bacillus* (que posee un sistema regulador muy complejo). Se estima que tan sólo en *E. coli* operan casi 50 sistemas de dos componentes diferentes, de los que algunos se relacionan en la Tabla 8.3. Muchos de estos sistemas implican regulación global (*véase* también Tabla 8.1). En *E. coli*, la osmolaridad del ambiente controla cuál de las dos proteínas de la membrana externa, OmpC u OmpF, se sintetiza. El regulador de respuesta de este sistema es OmpR. Cuando OmpR es fosforilado, actúa como un *activador* del gen *ompC* y como un *represor* de la transcripción del gen *ompF*.

En algunos casos, están implicados más elementos reguladores. Por ejemplo, en el *sistema Ntr*, que regula la asimilación de nitrógeno, el regulador de respuesta es una proteína activadora, RN_I (Regulador de Nitrógeno I), que funciona permitiendo la transcripción de genes bajo promotores reconocidos por la RNA polimerasa con el factor σ^{54}, un factor sigma alternativo (*véase* Tabla 8.2). Por otra parte, la quinasa sensora, RN_{II} (Regulador de Nitrógeno II) juega un doble papel, tanto de proteína quinasa como de fosfatasa, estando su actividad regulada por el nivel de fosforilación de otra proteína, P_{II}. Algunos sistemas son bastante complejos. El sistema regulador *Nar* implica dos proteínas sensoras diferentes y dos reguladores de respuesta diferentes, y además, todos los genes regulados por este sistema están también bajo el control de la proteína reguladora transcripcional anaeróbicamente activa, FNR (*véase* Tabla 8.1). Sistemas de dos componentes estrechamente relacionados con los bacterianos, están también presentes en microorganismos eucariotas, tal como *Saccharomyces cerevisiae*. Los eucariotas superiores también usan la fosforilación como un mecanismo de transducción de señales para responder a cambios ambientales.

✓ 8.10 Revisión de conceptos

Los sistemas de transducción de señales transmiten señales a la célula. En procariotas, la transducción de señales típicamente implica sistemas de dos componentes, que incluyen una proteína sensora de membrana y una proteína citoplásmica reguladora de respuesta. La proteína sensora es una quinasa, y la actividad del regulador de respuesta depende de su estado de fosforilación.

- ✓ ¿Qué son las *quinasas* y cuál es su papel en los sistemas reguladores de dos componentes?
- ✓ ¿Puede un regulador de respuesta ser un activador o un represor?

8.11 Regulación de la quimiotaxis

No todas las respuestas reguladoras regulan la transcripción. Ya hemos comentado el hecho de que las bacterias pueden moverse acercándose o alejándose de un

TABLA 8.3 Algunos sistemas reguladores de dos componentes de *Escherichia coli* que regulan la transcripción

Sistema	Señal ambiental	Quinasa sensora	Regulador de la respuesta	Actividad del regulador de la respuesta[a]
Sistema *Arc*	O_2	ArcB	ArcA	Represor/Activador
Nitrato y nitrito regulación anaerobia (Nar)	Nitrato y nitrito	NarX y NarQ	NarL NarP	Activador/Represor Activador/Represor
Utilización de nitrógeno (Ntr)	NH_4^+	NR_{II}, el producto de *glnL*	NR_I, el producto de *glnG*	Activa la RNA polimerasa a nivel de promotores que requieren σ^{54}
Regulón *Pho*	Fosfato inorgánico	PhoR	PhoB	Activador
Regulón porina	Presión osmótica	EnvZ	OmpR	Activador/Represor

[a] Nótese que varias proteínas que regulan la respuesta actúan como activadores y represores, dependiendo de los genes que estén siendo regulados. Aunque ArcA puede funcionar como activador o represor, funciona como represor en la mayoría de los operones que regula.

compuesto químico particular, un proceso denominado *quimiotaxis* (*veáse* Sección 4.12). Allí se hizo notar que las bacterias son demasiado pequeñas para sentir gradientes *espaciales* de una sustancia, y más bien responden a gradientes *temporales*. Esto es, pueden sentir el cambio en concentración de un compuesto fuera de la célula a *intervalos de tiempo*. Las bacterias usan un sistema de dos componentes para sentir los cambios temporales en composición química y regular el movimiento flagelar.

Mecanismos de quimiotaxis: respuesta a la señal

El mecanismo de quimiotaxis es bastante complejo e implica una variedad de proteínas diferentes. Varias de estas *proteínas sensoras* están en la membrana celular, y éstas sienten la presencia de atrayentes o repelentes. Estas proteínas permiten a la célula «sentir» si la concentración de la sustancia aumenta o disminuye con el tiempo cuando la célula se mueve. La célula responde de esta manera a *cambios* en la concentración más que a la concentración *absoluta* del estímulo químico. Las proteínas sensoras se denominan *proteínas aceptoras de grupos metilo* (*MCPs*) o *proteínas receptoras-transductoras* o, simplemente, **transductores**. En *Escherichia coli*, se han identificado cinco MCPs diferentes y todas son proteínas transmembranales (Figura 8.24). Cada MCP puede sentir una variedad de compuestos. Por ejemplo, el transductor *Tar* de *E. coli* puede sentir los atrayentes aspartato y maltosa, así como los repelentes metales pesados cobalto y níquel.

Las MCPs se unen a atrayentes o repelentes directamente, o en algunos casos indirectamente, a través de interacciones con proteínas de unión periplásmicas. La unión de un atrayente o un repelente dispara una serie de interacciones con proteínas citoplásmicas que eventualmente afectan a la rotación del flagelo. Si la rotación del flagelo es en sentido *antihorario*, la célula continúa la carrera en la misma dirección. Si el flagelo rota en sentido *horario*, la bacteria da un viraje (*véase* Sección 4.11).

El modelo actual de control flagelar indica que los transductores están en contacto con las proteínas citoplásmicas CheW y CheA (Figura 8.24). CheA es una *quinasa sensora*. Cuando un transductor ha ligado una sustancia química, cambia la conformación y (con CheW) causa un cambio en la autofosforilación de CheA (formando CheA-P). Los *atrayentes disminuyen* la velocidad de autofosforilación, mientras que los *repelentes la aumentan*. CheA fosforilado (CheA-P) fosforila a su vez a CheY (formando CheY-P), *un regulador de respuesta*. CheA-P puede también fosforilar CheB, otro regulador de respuesta, pero ésta es una reacción más lenta que la fosforilación de CheY. Discutiremos la actividad de CheB más tarde.

CheY es la proteína central del sistema porque sirve como *regulador de respuesta* para la quimiotaxis, gobernando la dirección de la rotación del flagelo. CheY-P interactúa con el motor flagelar para inducir la rotación horaria y el viraje (el cambio de dirección en el motor se lleva a cabo por proteínas codificadas por los genes *fla*; *véase* Sección 4.10). Si CheY no se fosforila, no puede unirse, el motor flagelar continúa girando en sentido antihorario y la célula hace una carrera. Otra proteína, CheZ, defosforila CheY, volviéndolo a la forma que permite carreras en lugar de virajes. Puesto que los repelentes aumentan el nivel de CheY-P, originan virajes, mientras que los atrayentes conducen bajo el nivel de CheY-P a un movimiento suave.

Mecanismo de la quimiotaxis: adaptación

El sistema descrito puede *señalizar* la unión de una sustancia química y regular la rotación flagelar pero parece incapaz de sentir un cambio a medida que pasa el tiempo. Hay un segundo componente de la quimiotaxis, que es la **adaptación**.

Como su nombre indica, las MCP_S pueden ser metiladas. Existe una proteína citoplásmica, CheR (Figura 8.24), que continuamente añade grupos metilo a las MCP_S a baja velocidad utilizando S-adenosilmetionina como donador de restos metilo. La forma fosforilada del regulador de respuesta CheB es una demetilasa que elimina grupos metilo de las MCP_S. El nivel de metilación de las MCPs afecta a

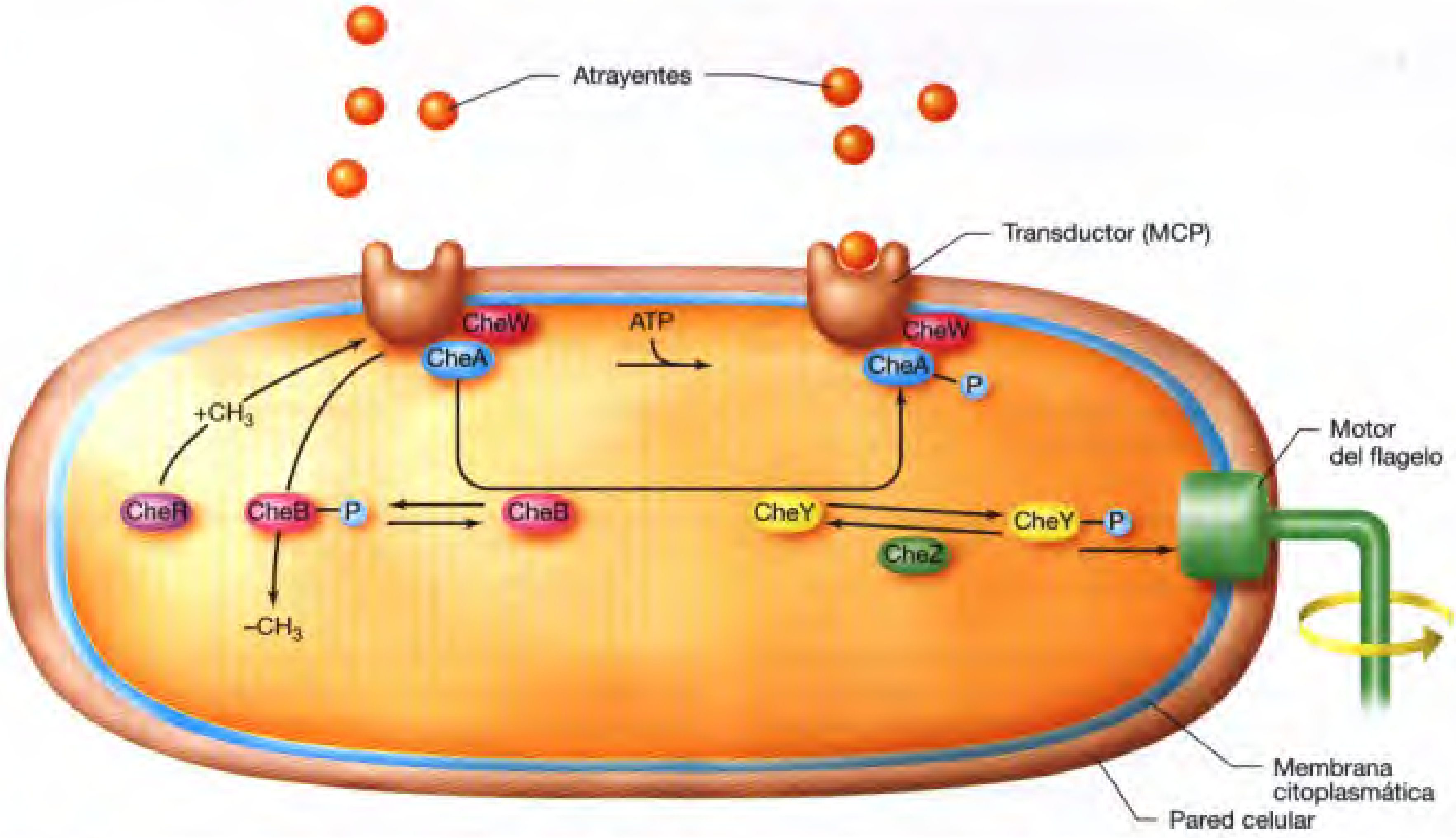


Figura 8.24 Interacciones entre transductores, proteínas de la quimiotaxis (Che), y el motor del flagelo en la quimiotaxis bacteriana. El transductor (MCP) forma un complejo con la *quinasa sensora* CheA y la proteína acopladora CheW. Esta combinación resulta en una señal que origina autofosforilación de CheA a CheA-P. CheA-P puede a su vez fosforilar a los reguladores de respuesta CheB y CheY. CheY fosforilado (CheY-P) interactúa directamente con el conmutador del motor del flagelo. CheZ desfosforila CheY-P. CheR añade continuamente grupos metilos al transductor. CheB-P (pero no CheB) los elimina. El grado de metilación de los transductores controla su capacidad para unir atrayentes y repelentes, y conduce a la adaptación. La estructura del motor del flagelo ya se mostró en la Figura 4.41.

su conformación y controla la adaptación a la señal sensora. Permite restablecer el nivel de sensibilidad de los receptores incluso cuando la concentración del compuesto químico permanezca inalterada.

Si el nivel de un atrayente permanece alto, el nivel de fosforilación de CheA (y, por tanto, de CheY y CheB) permanecerá bajo, la célula se moverá suavemente, y el nivel de metilación de MCP se incrementará (debido a que no existe CheB-P para desmetilar). Sin embargo, las MCPs no responden al atrayente cuando están totalmente metiladas. Así, incluso cuando el nivel de atrayente permanezca alto, el nivel de CheA-P (y CheB-P) incrementa y las células comienzan a dar virajes. Sin embargo, ahora las MCPs pueden ser desmetiladas por CheB-P, y cuando esto ocurre, los receptores pueden responder de nuevo a los atrayentes. La situación es la opuesta en lo que concierne a los repelentes (las MCPs totalmente metiladas responden mejor a los repelentes).

El control de la quimiotaxis es obviamente bastante complicado e implica varios circuitos regulatorios. A diferencia de otros muchos otros sistemas de dos componentes, en la quimiotaxis el sistema de transducción de señales regula la actividad de los productos génicos, no su síntesis.

✓ 8.11 Revisión de conceptos

La quimiotaxis está sometida a una regulación compleja que implica transducción de la señal y un sistema de dos componentes. Sin embargo, estos sistemas regulan la actividad de las proteínas implicadas más que su síntesis. La adaptación permite al sistema restablecer su sensibilidad inicial en presencia continua de la señal.

- ✓ ¿Qué son el *regulador de respuesta* primario y la *quinasa sensora* primaria implicados en la regulación de la quimiotaxis?
- ✓ ¿Por qué es importante la adaptación?

V PUNTUALIZACIONES FINALES SOBRE LA REGULACIÓN

Hemos revisado tan sólo algunos mecanismos por los que las células pueden controlar la actividad de una proteína, y también algunos mecanismos importantes que pueden regular su síntesis. La mayor parte de los mecanismos, aquí considerados, que regulan la síntesis, operan a nivel de transcripción, y todos ellos implican proteínas reguladoras. Sin embargo, como mencionamos, existen también RNA reguladores (*véase* cuadro «Ácido nucleico antisentido»).

8.12 Diferencias en la expresión génica entre procariotas y eucariotas

Aunque muchos de los principales modelos de regulación son compartidos por procariotas y eucariotas, existen muchas diferencias entre ellos. Dada la falta de compartimentalización en procariotas, los procesos de transcripción y traducción están *acoplados*. También, el RNA mensajero de los procariotas es frecuentemente policistrónico, originándose más de una proteína a partir del mismo mensaje.

En eucariotas, por otra parte, la transcripción y la traducción tienen lugar en compartimentos separados de la célula, y no existe la integración de estos procesos observada en procariotas. ¿Qué ocurre con la inducción y la represión en los eucariotas? Aunque muchos eucariotas presentan represión, existe poca evidencia de que exista en ellos el tipo de control negativo tan comúnmente observado en procariotas. Sin embargo, los mecanismos de control positivo son bastante comunes en eucariotas. Si existen operones en eucariotas, implican el control de una única enzima, más que el control de sistemas multienzimáticos tan comúnmente vistos en procariotas, y no hay evidencia de moléculas de RNA policistrónico en eucariotas excepto en el caso de unos pocos virus. Éstos son traducidos con escasa eficiencia. La modificación post-traduccional de proteínas es bastante común en eucariotas. La regulación en eucariotas implica también procesamiento de mRNA, que no existe en procariotas.

Es la regulación de los genes lo que posibilita el *desarrollo* de los organismos eucarióticos multicelulares, los cuales comienzan la vida como células únicas y se desarrollan hasta convertirse en organismos complejos con muchos y muy especializados tipos de células. Este proceso de diferenciación requiere que se activen juegos de genes específicos en el momento preciso del desarrollo del organismo. Las complejas rutas regulatorias implicadas en el desarrollo están siendo objeto de intensa investigación. El comprender y poder controlar estas rutas permitiría avances tremendos en medicina.

✓ 8.12 Revisión de conceptos

Los procariotas y eucariotas comparten muchos mecanismos reguladores similares. La regulación de ambos implica a proteínas que reconocen secuencias en el DNA, aunque en eucariotas el control positivo es más común. En procariotas, la transcripción y la traducción pueden estar acopladas, pero en eucariotas estos procesos ocurren en compartimentos separados. Los procariotas tienen también mensajeros policistrónicos mientras que los eucariotas no.

- ✓ ¿Qué mecanismo de control regulador hemos comentado que implique el acoplamiento entre la transcripción y la traducción?
- ✓ ¿Qué es un mRNA policistrónico?

Preguntas de repaso

1. Si una enzima puede ser inhibida eficientemente por retroinhibición, ¿por qué tienen las células también mecanismos para regular su síntesis?
2. Compare el procesamiento de la proinsulina y el del producto del gen *gyrA* de *Mycobacterium leprae* (*véase* cuadro, «Procesamiento de proteínas»). En ambos casos se elimina un péptido «interno». Sin embargo, sólo en el segundo se considera procesamiento de proteína. Explíquese.
3. Compare y diferencie entre *intrones* e *inteínas*.
4. Describa por qué una proteína que se une a una secuencia específica de DNA bicatenario es improbable que se una a la misma secuencia de DNA monocatenario.
5. Algunos operores están bajo el control de un operador pero otros no. Explíquelo.
6. Describa la regulación de dos operones diferentes, uno que posea un efector que es un *inductor*, y otro que tenga un efector que sea un *correpresor*.
7. El regulón de la maltosa es inducible y es regulado por una proteína activadora. El operón de la lactosa es inducible pero es regulado por una proteína represora. Explique cómo puede conseguirse la inducción por control positivo y control negativo.
8. La mayoría de los operadores están muy cercanos a los promotores que controlan, mientras que los sitios de unión de los activadores pueden estar más alejados. Explicar por qué esto es así.
9. Describa cómo funciona el mecanismo de la activación. ¿Qué se «atenúa» en realidad?¿Por qué este tipo de control que en *Escherichia coli* controla distintas vías de síntesis de aminoácidos, no ha sido encontrado en eucariotas?
10. Describa el mecanismo por el que actúa la proteína activada por metabolito (CAP), que controla la represión catabólica, utilizando el operón lactosa como ejemplo. En este operón, CAP no es un represor. Describa la región reguladora de un gen para el que CAP sea un represor. (*Sugerencia*: piense en su contestación a la Pregunta 6.)
11. ¿Cuáles son los dos componentes que dan nombre a la regulación por transducción de señales en procariotas?¿Cuál es la función de cada componente?
12. Uno de los miembros de un sistema de dos componentes está típicamente localizado en la membrana celular. ¿Por qué cree que esto es así?

13. Muchos genes están bajo múltiples sistemas de control. En el operón lactosa hay una regulación específica y una regulación por un sistema de control global. Describa cómo funciona cada uno de los controles. ¿Por qué cree que ambos sistemas son necesarios?

14. La adaptación permite restablecer el mecanismo regulador que controla la rotación flagelar. ¿Cómo se lleva a cabo?

Ejercicios prácticos

1. Los aminoácidos isoleucina y valina comparten una vía común para la mayoría de los pasos de su biosíntesis. En *Escherichia coli*, la primera etapa común puede estar sujeta a inhibición por retroalimentación por la valina pero no por la isoleucina. En la mayoría de las cepas, sin embargo, la adición de valina no causa deprivación de leucina. Sin embargo, en otras cepas sí la causa (esto es, la adición de valina causa deprivación de leucina y las células detienen su crecimiento). ¿Qué explicación da a las diferencias entre las cepas normales «resistentes a valina» y aquéllas cuyo crecimiento es sensible a valina?

2. ¿Qué ocurriría con la regulación desde un promotor bajo control negativo si se deleciona la región donde se une la proteína reguladora? ¿Qué ocurriría si el promotor estuviera bajo control positivo?

3. Los promotores de *Escherichia coli* bajo control positivo difieren de la secuencia consenso de esta bacteria (*veáse* Sección 7.9). ¿Por qué?

4. El control de la atenuación de algunos de los genes de la ruta biosintética de pirimidinas en *Escherichia coli* implica que la transcripción y la traducción se produzcan simultáneamente. ¿Puede describir un mecanismo por el que la célula pueda de alguna manera utilizar la traducción para cuantificar los niveles de nucleótidos de pirimidina?

5. La mayoría de los sistemas de regulación descritos en este capítulo explican a proteínas reguladoras. No obstante, se sabe que existen RNA reguladores. Describa cómo puede lograrse el control negativo del operador *lac* usando una molécula de RNA regulador.

Los virus son agentes infecciosos que necesitan a las células para poder reproducirse. Al igual que las células, los virus tienen un genoma, pero el genoma viral contiene una información genética insuficiente para replicarse independientemente. Aunque el material genético de muchos virus es ácido desoxirribonucleico bicatenario (DNA), en otros, el material genético es DNA monocatenario, y, en algunos, es ácido ribonucleico (RNA). La forma infecciosa de un virus es una partícula llamada *virión* (en la figura se muestra la del virus del papiloma humano) que contiene el material genético rodeado de una cubierta proteica.

9

VIROLOGÍA BÁSICA

I VIRUS Y VIRIONES 232
9.1 Propiedades generales de los virus 232
9.2 Naturaleza del virión 234
II CRECIMIENTO Y CUANTIFICACIÓN 237
9.3 El hospedador del virus 237
9.4 Cuantificación del virus 238
III REPLICACIÓN VÍRICA 240
9.5 Características generales de la replicación vírica 240
9.6 Etapas en la multiplicación vírica: fijación y penetración 241
9.7 Etapas en la multiplicación vírica: producción de ácido nucleico y proteínas víricas 244
IV DIVERSIDAD VÍRICA 246
9.8 Generalidades de virus de bacterias 246
9.9 Bacteriófagos virulentos: T4 247
9.10 Bacteriófagos atemperados: lambda 250
9.11 Generalidades de los virus de animales 255
9.12 Retrovirus 258
9.13 Viroides y priones 260

UNIVERSIDAD DE TALCA
BIBLIOTECA CENTRAL

Glosario

Bacteriófago un virus que infecta células procarióticas

Banda más (positiva) una banda de RNA o DNA que tiene el mismo sentido que el mRNA del virus

Banda menos (negativa) del ácido nucleico una banda de RNA o DNA que tiene sentido opuesto al (es complementaria de) mRNA del virus

Ciclo lisogénico una serie de etapas que, tras la infección del virus, conducen a un estado (lisogenia) en el que el genoma vírico se replica como un profago junto con el genoma del hospedador

Ciclo lítico una serie de etapas tras la infección del virus que conduce a la replicación vírica y destrucción (lisis) de la célula hospedadora

Lisógeno una bacteria que contiene un profago

Oncogen un gen cuya expresión causa la formación de un tumor

Placa una zona de lisis o inhibición celular causada por la infección vírica de un césped de células sensitivas

Prión un agente infeccioso cuya forma intracelular puede no contener ácido nucleico

Provirus (profago) el genoma de un virus temperado cuando se está replicando con, generalmente integrado en, el cromosoma del hospedador

Retrovirus un virus cuyo genoma RNA tiene un DNA intermediario como parte de su ciclo replicativo

Trancripción reversa el proceso de copiar a DNA la información presente en el RNA

Transformación un proceso por el que una célula normal se convierte en una célula cancerosa (*véase también* otro significado alternativo en el Capítulo 10)

Virión la partícula del virus completa; el ácido nucleico rodeado de una cubierta proteica o, a veces, de otro material

Viroide pequeño, circular, de cadena sencilla

Virus un elemento genético que contiene RNA o DNA y se replica dentro de las células pero se caracteriza también por tener un estado extracelular

Virus atemperado un virus cuyo genoma es capaz de replicarse junto con el de su hospedador y no causa muerte celular en un estado denominado lisogenia

Virus virulento un virus que lisa o mata la célula hospedadora después de la infección; un virus no temperado

---

Los **virus** son elementos genéticos que pueden replicarse independientemente de los cromosomas de una célula pero no independientemente de dicha células (*véase* Sección 7.4). A fin de multiplicarse, los virus deben entrar en una célula en la cual puedan replicarse. Dicha célula se denomina *hospedadora*. Los virus se caracterizan también por tener una forma infecciosa madura que es típicamente extracelular.

Los virus, al igual que los plásmidos y otros elementos genéticos (*véase* Sección 7.4), se aprovechan de la maquinaria metabólica codificada por los cromosomas de la célula hospedadora. Como otros elementos, los virus pueden conferir importantes propiedades a la célula hospedadora. Estas propiedades serán heredadas cuando la célula se divida, si las dos células hijas heredan el genoma vírico. Estos cambios frecuentemente no son dañinos, e incluso pueden ser beneficiosos. Sin embargo, los virus a diferencia de los otros elementos genéticos como los plásmidos (*véanse* Secciones 7.4 y 10.8), tienen una forma extracelular que los capacita para ser fácilmente transmitidos de un hospedador a otro. Esta forma extracelular ha capacitado a los virus a replicarse dentro de un hospedador de una manera dañina para la célula hospedadora. Esta replicación destructiva es la causa de que algunos virus sean agentes de enfermedades. En muchos casos, el que un virus cause enfermedad o cambio hereditario depende de la célula hospedadora y de las condiciones ambientales. Debido a que los virus tienen una fase independiente de las células, algunas personas los denominan «organismos vivos» o «formas de vida». Sin embargo, como discutiremos luego, algunas de las propiedades que caracterizan a los sistemas vivientes (*véase* Sección 1.2) no se dan en la forma extracelular de los virus. Sin células en las que replicarse, no podrían existir los virus.

En este capítulo discutiremos algunos de los modos en los que los virus pueden redirigir el metabolismo celular para poder replicarse. Este capítulo se divide en cuatro partes. La primera introduce los conceptos básicos de la estructura de un virus. La segunda trata de las células hospedadoras y de cómo pueden cuantificarse los virus. La tercera trata de la biología molecular básica de la multiplicación vírica. La cuarta da una idea general de algunos virus que infectan bacterias y animales (en el Capítulo 16 puede encontrarse más información acerca de virus específicos). Estas discusiones amplían los conceptos de síntesis macromolecular y regulación génica, ya tratados en los Capítulos 7 y 8.

Los virus están entre los más numerosos «microorganismos» de nuestro planeta e infectan todos los tipos de organismos celulares. Por tanto, son interesantes por sí mismos. Sin embargo, los científicos han estudiado y siguen estudiando los virus por lo que pueden enseñarnos sobre la genética y bioquímica del metabolismo celular y, en el caso de algunos virus, sobre el desarrollo de las enfermedades. Además, como veremos en los Capítulos 10, 15 y 31, los virus son también importantes herramientas para la genética microbiana y la ingeniería genética.

I VIRUS Y VIRIONES

9.1 Propiedades generales de los virus

Describiremos aquí los estados intra y extracelular de los virus. En el estado **extracelular**, un virus es una partícula minúscula que contiene ácido nucleico rodeado por proteína y que, dependiendo del virus específico, ocasionalmente contiene otros componentes macromoleculares. En este estado extracelular, la **partícula vírica**, también llamada **virión**, es metabólicamente inerte y carece de funciones respiratorias y biosintéticas. El virión es la estructura mediante la cual el genoma del virus se transporta desde la célula en la que se ha producido a otra célula en la que el ácido nucleico vírico puede ser introducido. Una vez dentro de la nueva célula, se inicia el **estado intracelular**. Durante este estado tiene lugar la **replicación del virus**: se producen nuevas copias del genoma vírico, y se sintetizan los componentes de la cubierta del virus. Cuando un genoma vírico se introduce y se reproduce en una célula hospedadora, el proceso se denomina **infección**. La célula que puede ser infectada por un virus que, además, se reproduce en ella, se denomina **hospedador**. Los genomas virales son muy limitados en tamaño y codifican primariamente las funciones que no pueden adaptar de sus hospedadores. Por tanto, durante la replicación dentro de una célula, los virus dependen de manera determinante de los componentes estructurales y metabólicos de las células hospedadoras. El virus reconduce las funciones metabólicas y la maquinaria del hospedador al servicio de su propia replicación y al ensamblaje de los nuevos viriones. (Por tanto, para la mayoría de los virus pueden encontrarse viriones dentro de la célula al final de la infección.)

Genomas víricos

Como hemos visto (*véase* Sección 7.1), todas las células tienen ácido desoxirribonucleico de doble cadena (DNA) como material genético. Por el contrario, los virus contienen o bien DNA o ácido ribonucleico (RNA) como material genético, y en ambos casos puede ser de cadena sencilla o doble. Los virus se dividen a veces en dos tipos, según contengan DNA o RNA como material genético, y *todos* los virus contienen uno u otro en el virión. Sin embargo, existe un tercer tipo de virus que usan *ambos*, DNA y RNA, como material genético, pero en distintos estadios de su ciclo reproductivo (Figura 9.1). El último grupo incluye los retrovirus, que contienen un genoma de RNA en el virión pero se replican a través de un intermediario de DNA, y el virus de la hepatitis B, que contiene DNA en el virión pero tiene RNA como intermediario de replicación. Estas clases pueden ser subdivididas sobre la base de si el ácido nucleico del virión es de cadena sencilla o doble (Figura 9.1). La clasificación de los virus basada en el tipo de ácido nucleico en los viriones y las estrategias de replicación asociadas a los mismos ha sido formalizada como el Sistema de Clasificación de Baltimore que discutiremos en la Sección 9.7.

A pesar de la diversidad en la estructura del genoma, los virus obedecen al *dogma central* de la biología molecular (*véase* Sección 7.1): toda la información genética fluye desde el ácido nucleico a la proteína. Además, todos los virus usan la maquinaria traduccional de la célula; y así, con independencia de la estructura del genoma vírico, debe generarse RNA mensajero (mRNA) que pueda ser traducido en los ribosomas del hospedador.

Hospedadores de virus y taxonomía

Los virus pueden clasificarse también en función de los hospedadores que pueden infectar. Así, tenemos virus de animales, virus de plantas y virus bacterianos. Los virus de bacterias, a veces llamados **bacteriófagos** (o, abreviadamente, *fago*, del griego *phagein* que significa «comer»), han sido estudiados primariamente como sistemas modelo convenientes de investigación en biología molecular y genética de la reproducción vírica.

Muchos de los conceptos básicos de virología se generaron trabajando con virus bacterianos y se aplicaron posteriormente a virus de organismos superiores. Dada su frecuente importancia médica, los *virus de animales* también llamados virus animales han sido estudiados extensamente. Los dos grupos de virus animales más estudiados son los que infectan insectos y los que infectan animales de sangre caliente. Los *virus de plantas* o virus vegetales son importantes en agricultura y han sido menos estudiados que los virus de animales.

Finalmente, existe un sistema formal de taxonomía vírica que organiza los virus en niveles taxonómicos jerárquicos: orden, familia (y subfamilia), genero y especie. Aunque, a veces, este sistema taxonómico formal puede parecer bastante arbitrario (y a pesar de que los nombres comunes están todavía en uso), su utilidad aumenta continuamente debido al incremento de los datos filogenéticos que se van acumulando. El taxón familia parece particularmente útil. Los miembros de una familia de virus poseen morfología (del virión), estructura del genoma y/o estrategias de replicación distintivas. Las familias de virus tienen nombres que incluyen el sufijo *-viridae* (como en *Poxviridae*) y discutiremos varias de ellas en el Capítulo 16.

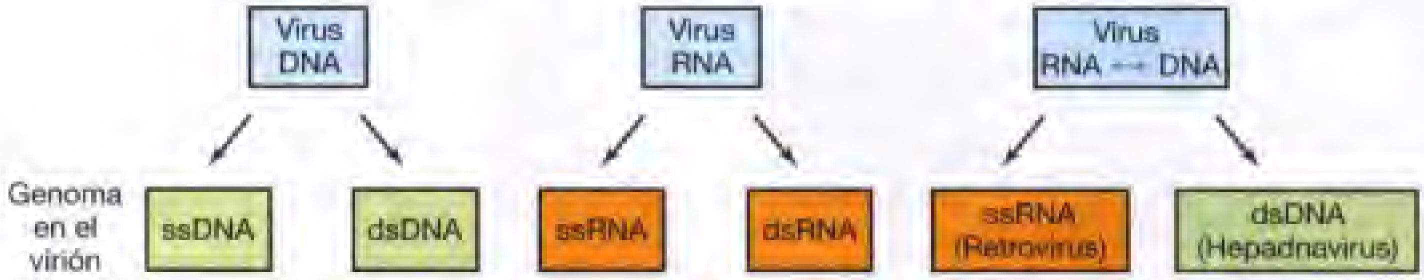


Figura 9.1 Genomas víricos. Los genomas víricos pueden estar compuestos de DNA o RNA, y algunos virus usan ambos tipos de material genómico en diferentes fases de su ciclo de vida. Sin embargo, en el virión de cualquier tipo particular de virus sólo se encuentra un tipo de ácido nucleico, que puede ser monocatenario (ss), bicatenario (ds), o, en el caso de los hepadnavirus, parcialmente bicatenario.

✓ 9.1 Revisión de conceptos

Un virión es una forma extracelular de un virus que contiene un genoma de DNA o RNA. El genoma vírico se introduce en una nueva célula hospedadora mediante infección. El virus redirige el metabolismo del hospedador para soportar la replicación vírica. Los virus se clasifican tentativamente por las estrategias de replicación o por el tipo de hospedador.

- ✓ ¿En qué difiere un *virus* de un *plásmido*?
- ✓ ¿En qué difiere un *virión* de una *célula*?

9.2 Naturaleza del virión

Las partículas víricas (viriones) varían ampliamente en tamaño y forma. Los virus son más pequeños que las células, oscilando en tamaño desde 0,02 a 0,3 µm. Una unidad común de medida para los virus es el *nanómetro*, que es 1.000 veces más pequeño que 1µm y 1 millón de veces más pequeño que 1 mm. El virus de la viruela, uno de los virus más grandes, tiene un diámetro de unos 200 nm (algo más pequeño que la *Bacteria* más pequeña); los poliovirus están entre los más pequeños, con sólo 28 nm de diámetro (aproximadamente el tamaño de un ribosoma).

Como hemos indicado, algunos virus contienen RNA y otros DNA, y el ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o doble, dependiendo del virus. Los *genomas* víricos son también más pequeños que los de la mayoría de las células. La mayoría de los genomas bacterianos poseen entre 1000 y 5000 kilopares de bases de DNA, siendo el más pequeño de 580 kilopares de bases. (Resulta interesante que las *Bacteria* con los genomas más pequeños son, al igual que los virus, parásitos que se replican en otras células; *véanse* Secciones 12.13 y 12.27.) Sin embargo, el genoma vírico más grande conocido, el del bacteriófago G, es de 670 kilopares de bases. Este virus, que infecta a *Bacillus megaterium*, es, sin embargo, el único virus conocido cuyo genoma es más grande que un genoma celular. Los tamaños de los genomas de los virus más típicos se indican en la Tabla 9.1. Algunos virus tienen genomas tan pequeños que contienen menos de cinco genes. Como se puede ver en la tabla, el genoma de algunos virus, tal como los reovirus, está segmentado en más de una molécula.

Las estructuras de los viriones son bastante diversas, variando en tamaño, forma y composición química. El ácido nucleico del virión está siempre localizado dentro de la partícula, rodeado por una cubierta proteica llamada *cápsida*. Los términos de *cubierta* y *cápsida* son frecuentemente intercambiables y se refieren a esta capa externa. La cubierta proteica está siempre formada por un número determinado de moléculas de proteínas individuales, llamadas *subunidades estructurales*, que se disponen siguiendo un modelo preciso y altamente repetitivo alrededor del ácido nucleico (Figura 9.2). El pequeño genoma de la mayoría de los virus restringe el número de proteínas víricas diferentes. Algunos virus tienen un solo tipo de proteína en su cápsida, pero la mayoría tienen varias subunidades estructurales químicamente distintas que están asociadas de maneras específicas para formar estructuras mayores llamados *capsómeros*. El capsómero es la unidad morfológica que puede apreciarse al microscopio electrónico.

La información para la agregación apropiada de las subunidades estructurales en capsómeros se encuentra dentro de la estructura de las propias proteínas, y el proceso global de ensamblaje se denomina **autoensamblaje**. En muchos virus, este proceso de autoensamblaje está asistido por *chaperones moleculares*, proteínas que ayudan en el plegamiento y ensamblaje pero que no forman parte de la estructura final (*véase* Sección 7.16). Un único virión tiene generalmente un gran número de unidades morfológicas. El complejo de ácido nucleico y proteína empaquetado en una partícula vírica se llama **nucleocápsida** vírica. Dentro del virión existen una o más *enzimas* específicas del virus.

TABLA 9.1 Algunos tipos de genomas víricos[a]

		Genoma vírico			
Virus	**Hospedador**	**Tipo de ácido nucleico en el virión**	**Estructura**	**Número de moléculas**	**Tamaño**
Parvovius H-1	Animales	DNA monocatenario	Lineal	1	5176 bases
ϕX174	*Bacteria*	DNA monocatenario	Circular	1	5386 bases
Virus 40 de simios (SV40)	Animales	DNA bicatenario	Circular	1	5243 pares de bases
Poliovirus	Animales	DNA monocatenario	Lineal	1	7433 bases
Virus del mosaico de la coliflor	Plantas	DNA bicatenario	Circular	1	8025 pares de bases
Virus del mosaico del guisante	Plantas	DNA monocatenario	Lineal	2 diferentes	9370 bases (total)
Reovirus tipo 3	Animales	DNA bicatenario	Lineal	10 diferentes	23 549 pares de bases (total)
Bacteriófago lambda	*Bacteria*	DNA bicatenario	Lineal	1	48 514 pares de bases[b]
Virus del Herpes simplex tipo I	Animales	DNA bicatenario	Lineal	1	152 260 pares de bases
Bacteriófago T4	*Bacteria*	DNA bicatenario	Lineal	1	168 903 pares de bases
Citomegalovirus humano	Animales	DNA bicatenario	Lineal	1	229 351 pares de bases

[a] El tamaño de los genomas virales escogidos en esta tabla se conoce con exactitud porque han sido secuenciados. Sin embargo, esta exactitud puede ser equivoca porque sólo se ha secuenciado una cepa o aislamiento particular del virus. Por tanto, la secuencia y el número exacto de bases de otros aislamientos puede diferir ligeramente. No se ha intentado escoger el mayor y el menor de los virus conocidos, sino más bien una muestra representativa de los tamaños y estructuras de los genomas víricos que contienen tanto RNA como DNA mono- o bicatenarios.

[b] El total incluye las extensiones de 12 nucleótidos de cada extremo de la forma lineal de DNA (*véase* Sección 9.10).

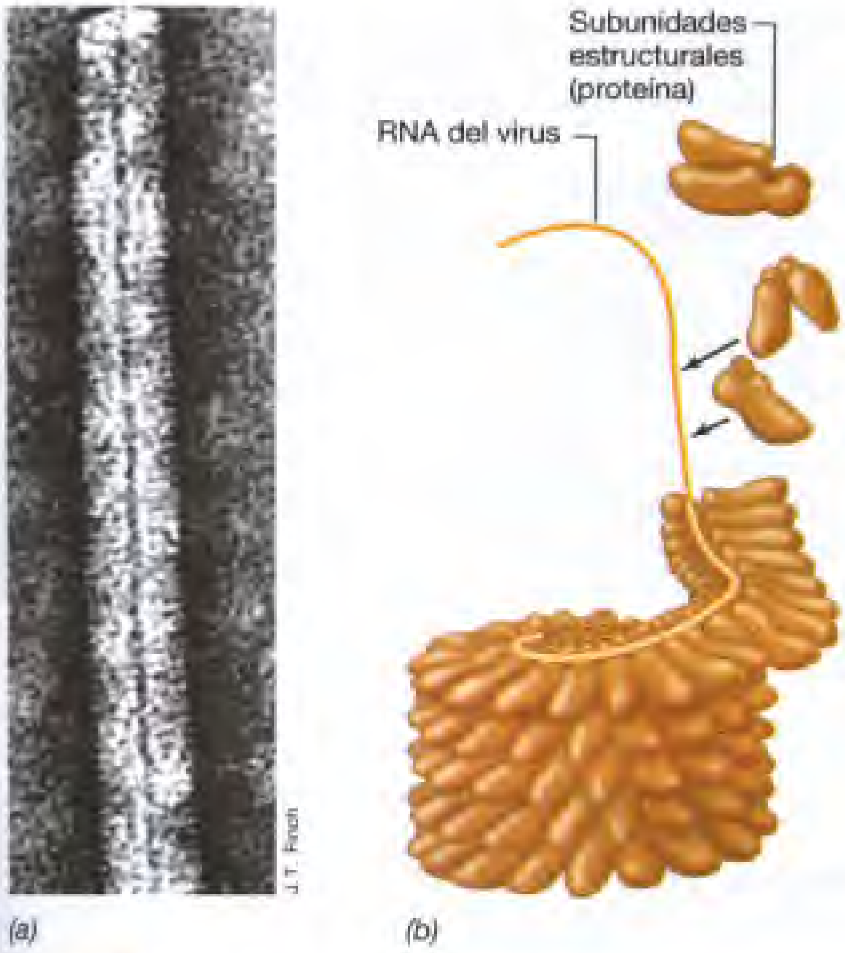


Figura 9.2 Ejemplo de la disposición del ácido nucleico vírico y de la proteína de la cubierta en un virus simple, como el causante del mosaico del tabaco. (a) Microscopía electrónica de alta resolución de una porción de la partícula vírica. (b) Ensamblaje del virión del mosaico del tabaco. El RNA adopta una configuración helicoidal rodeado por la proteína de la cápsida. El centro de la partícula es hueco.

Tales enzimas suelen jugar algún papel durante los procesos de infección y replicación, como comentaremos más adelante en este capítulo.

Aunque la estructura del virus que acabamos de describir suele ser la estructura total de una partícula vírica, algunos virus tienen estructuras más complejas. En los virus *envueltos*, la nucleocápsida está rodeada por una membrana (Figura 9.3). (Los virus sin membranas se denominan a veces virus *desnudos*.) Las membranas víricas son generalmente bicapas lipídicas (*véase* Sección 4.5), a las que a menudo se asocian proteínas *específicas del virus*.

Simetría de los virus

Las nucleocápsidas víricas están construidas de una manera altamente simétrica. La simetría se refiere a la manera en que las unidades morfológicas proteicas se ordenan en la cubierta vírica. Cuando una estructura simétrica se rota alrededor de un eje, se ve de nuevo la misma forma tras un número determinado de grados de rotación. En los virus se reconocen dos tipos de simetría, que se corresponden con las dos formas primarias que poseen: la cilíndrica y la esférica. Los virus con forma alargada tienen simetría helioidal, y los virus esféricos, simetría icosaédrica. En todos los casos, la estructura característica del virus está determinada por la estructura de las subunidades de proteína que la componen.

Un virus típico **con simetría helicoidal** es el virus del mosaico del tabaco (TMV) ilustrado en la Figura 9.2. Es un virus RNA compuesto de 2.130 subunidades proteicas idénticas ordenadas en una hélice. Las dimensiones globales del virión del TMV son 18 × 300 nm. Las longitudes de los virus helicoidales están determinadas por la longitud del ácido nucleico, pero la anchura de la partícula vírica helicoidal está determinada por el tamaño y disposición de las subunidades proteicas.

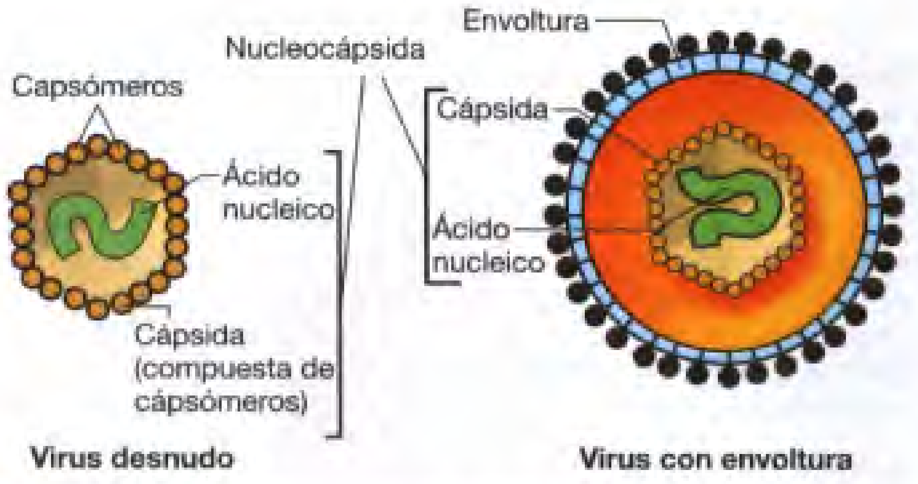


Figura 9.3 Comparación de dos tipos básicos de partículas víricas, virus desnudos y virus con envoltura.

Un **icosaedro** es una estructura simétrica de forma casi esférica que tiene 20 caras. La simetría icosaédrica es el modo más eficiente de ordenar subunidades en una cubierta cerrada, ya que usa el menor número de unidades para construir una cápsida. El ordenamiento más simple de unidades morfológicas es de 3 por cara, lo que da un total de 60 unidades en la partícula vírica. Las tres unidades de cada cara pueden ser idénticas o diferentes. La mayoría de los virus tienen más ácido nucleico del que puede ser empaquetado en una cápsida de sólo 60 unidades. La siguiente estructura posible que permite el empaquetamiento contiene 180 unidades, y muchos virus tienen cápsidas con esta configuración. Otras configuraciones conocidas contienen 240 y 420 unidades, respectivamente. La Figura 9.4*a* muestra un modelo de icosaedro. La 9.4*b* muestra una micrografía de un virus icosaédrico típico (el virus del papiloma humano; HPV). La Figura 9.4*c* muestra un modelo computerizado del mismo virus.

Virus envueltos

Muchos virus tienen complejas estructuras membranosas rodeadas por una nucleocápsida (Figura 9.5*a*). Los virus envueltos son comunes en el mundo animal (por ejemplo, el virus de la gripe), pero también se conocen virus envueltos de bacterias y plantas. La envoltura del virus consiste en una bicapa lipídica con proteínas, generalmente glicoproteínas, embebidas en ella. Los lípidos de la membrana derivan de las membranas de la célula hospedadora, pero las proteínas son codificadas por el virus. La simetría de los virus envueltos no se refiere al virión completo, sino a la nucleocápsida que está dentro de la membrana vírica.

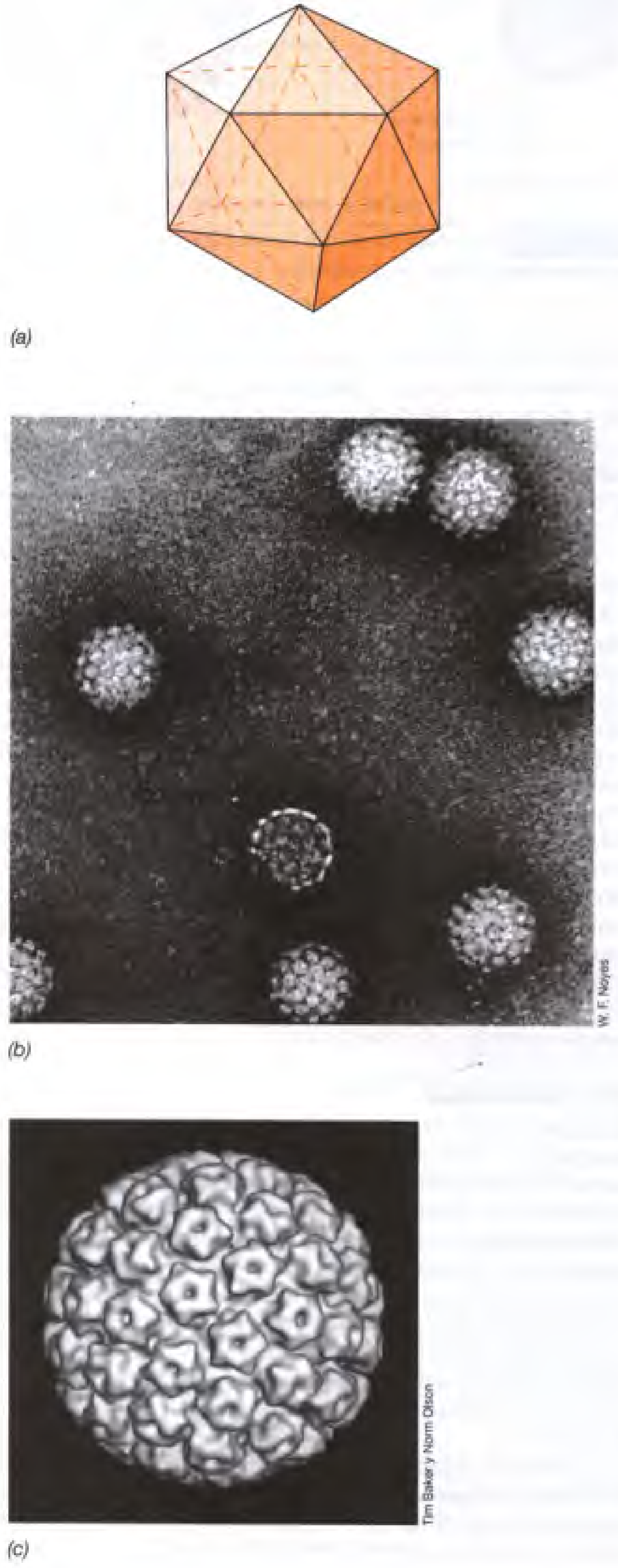
¿Cuál es la función de la membrana en la partícula vírica? Discutiremos este punto en detalle más adelante, pero debemos hacer notar que la membrana es el primer componente estructural de la partícula vírica que interacciona con la célula. La especificidad de la infección vírica, y algunos aspectos de la penetración del virus, están en parte controlados por características de la membrana vírica.

Virus complejos

Algunos viriones son incluso más complejos, estando compuestos de varias partes, cada una con diferentes formas y simetrías. Los virus más complicados en términos de estructura son virus bacterianos que poseen no sólo cabezas icosaédricas sino también colas helicoidales (Figura 9.5*b*). En algunos virus bacterianos, tales como el virus T4 de *Escherichia coli*, la propia cola tiene una estructura compleja. Por ejemplo, el T4 tiene casi 20 proteínas diferentes en la cola, y la cabeza del T4 tiene varias proteínas más. En estos virus complejos, el ensamblaje es también complejo. Por ejemplo, en el T4 la cola completa se forma como un subensamblaje, y posteriormente se une a la cabeza que ya contiene el DNA. Finalmente, las fibras de la cola formadas por otra proteína se adicionan para formar la partícula de virus madura e infecciosa.

Enzimas en viriones

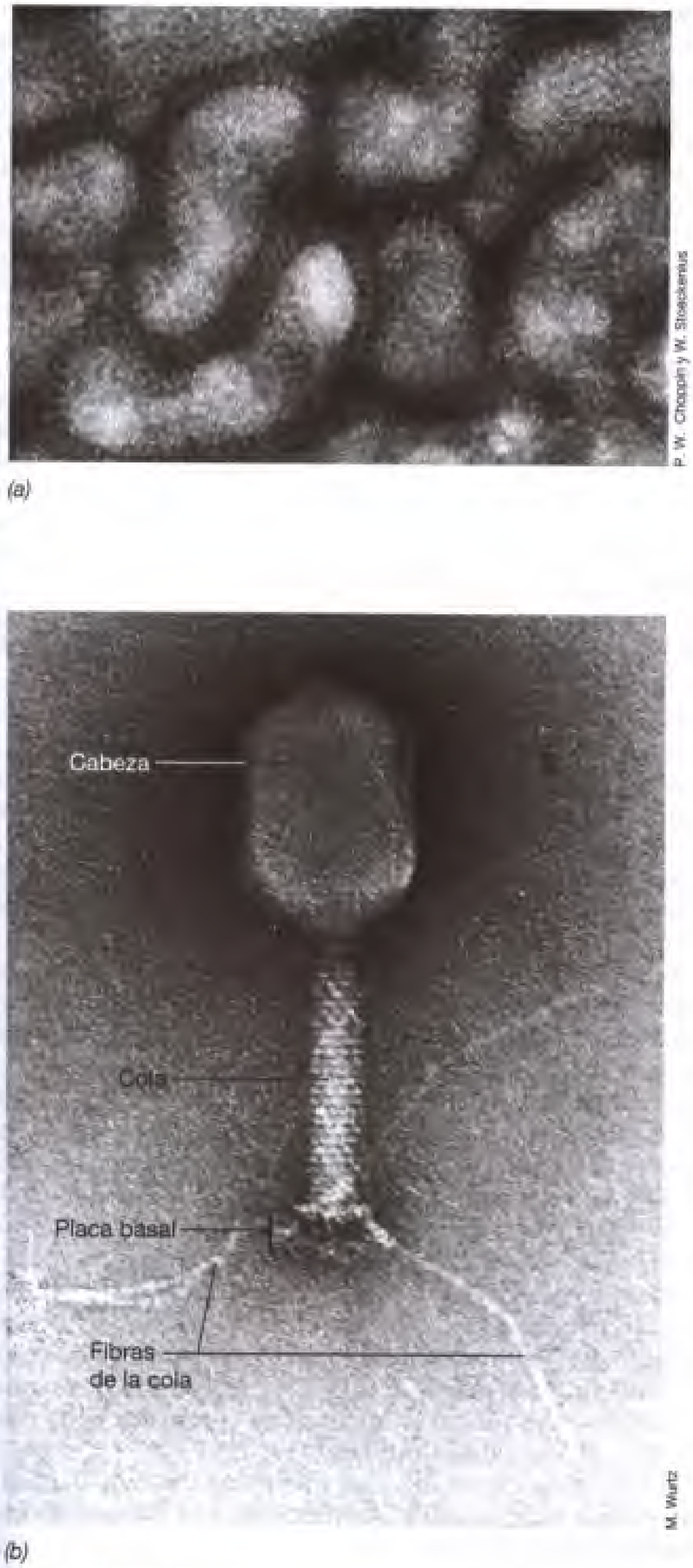
Ya hemos dicho que los viriones no llevan a cabo procesos metabólicos. Fuera de la célula hospedadora, un virión es metabólicamente inerte. Sin embargo, algunos viriones contienen enzimas que colaboran en el proceso infeccioso. Algunas de estas enzimas se requieren para los primeros pasos del proceso de infección. Por ejemplo, los viriones que infectan algunas bacterias poseen una enzima, *lisozima* (*veáse* Sección 4.8), que hace un pequeño agujero en la pared celular bacteriana para permitir la entrada del ácido nucleico vírico. (La lisozima se produce en grandes cantidades en los últimos estadios de la infección, causando la lisis de la célula hospedadora y la liberación de los viriones.) También, algunos virus contienen sus propias polimerasas de ácidos nucleicos para transcribir el ácido nucleico vírico a RNA mensajero (sin utilizar enzimas celulares), o porque requieren una enzima ausente en la célula hospedadora. Por ejemplo, los retrovirus son virus RNA que se replican dentro de la célula utilizando DNA como intermediario. Estos virus poseen una enzima llamada *transcriptasa reversa*, que transcribe la información del RNA introducido en la célula en un DNA intermediario. Otros virus contienen enzimas que ayudan a la liberación de los virus de la célula hospedadora en la que son producidos. Un grupo de estas enzimas, llamadas *neuraminidasas*, rompen enlaces glicosídicos de las proteínas y glicolípidos del tejido conectivo de las células animales, ayudando así a la liberación del virus.



W. F. Noyes

Tim Baker y Norm Olson

Figura 9.4 Simetría icosaédrica. (a) Modelo de icosaedro. (b) Micrografía electrónica del virus del papiloma humano, un virus con simetría icosaédrica. Las partículas individuales son de unos 55 nm de diámetro. (c) Reconstrucción tridimensional del virus del papiloma humano a partir de las imágenes de viriones sometidos a congelación-hidratación.



P. W. Choppin y W. Stoeckenius

M. Wurtz

Figura 9.5 Micrografías electrónicas de virus de animales y bacterianos. (a) Virus de la gripe, un virus con envoltura. Las partículas individuales tienen unos 80 nm de diámetro. (b) Virus bacteriano (bacteriófago) T4 de *Escherichia coli*. Obsérvese la estructura compleja. Los componentes de la cola están implicados en la fijación del virión al hospedador y en la penetración del ácido nucleico. La cabeza tiene unos 85 nm de diámetro.

✓ 9.2 Revisión de conceptos

En el virión de los virus desnudos, sólo están presentes ácido nucleico (DNA o RNA) y proteína, estando el ácido nucleico en el interior; el conjunto se denomina nucleocápsida. Los virus envueltos tienen una o más capas de lipoproteína rodeando la nucleocápsida. La nucleocápsida se dispone de una manera simétrica, con un número preciso y ordenamientos de subunidades estructurales rodeando el ácido nucleico del virus. Aunque los virus son metabólicamente inertes, en algunos virus poseen una o más enzimas en el interior del virión. Tales enzimas ejercen su función en los estadios iniciales del proceso infectivo.

✓ ¿Cuál es la diferencia entre un virus *desnudo* y un virus *envuelto*?

✓ ¿Qué tipos de enzimas pueden encontrarse dentro de los viriones de virus específicos?

II CRECIMIENTO Y CUANTIFICACIÓN

9.3 El hospedador del virus

Dado que los virus sólo se replican en el interior de células vivas, su investigación requiere el uso de hospedadores apropiados. De los tres tipos de hospedador, bacterias, plantas y animales, los virus que infectan bacterias son los más fáciles de crecer en el laboratorio.

Para el estudio de los virus bacterianos, se utilizan cultivos puros en medios líquidos o semisólidos (agar). Puesto que existen muchas bacterias fáciles de cultivar, resulta bastante fácil estudiar los virus bacterianos, y por esta razón se posee un conocimiento tan detallado de la multiplicación de los virus bacterianos.

Resulta más difícil trabajar con virus vegetales, ya que su estudio requiere a veces el uso de la planta entera. La infección de las plantas por los virus requiere frecuentemente un orificio en la gruesa pared celular. Algunas veces estos virus se ensayan produciendo un daño mecánico a la hoja de la planta, seguido de la aplicación del virus al área dañada. Sin embargo, algunos virus de plantas pueden ensayarse utilizando protoplastos (*véase* Sección 4.8) y otras técnicas de cultivos celulares líquidos.

Aunque inicialmente un virus de animal puede crecer en el animal entero que es susceptible al virus, a efectos de investigación es deseable disponer de un hospedador más manejable. Afortunadamente, muchos virus de animales pueden ser cultivados en *tejidos* o *cultivos celulares*, y el uso de tales cultivos ha facilitado enormemente la investigación de virus animales.

Cultivos celulares

Un cultivo celular se obtiene induciendo el crecimiento de células de un órgano del animal de experimentación. Las células se obtienen generalmente por separación quirúrgica aséptica de porciones del tejido en cuestión, disociación de las mismas mediante tratamiento con una enzima que rompe el cemento intercelular, y extensión de la suspensión resultante en el fondo de una superficie plana, tal como una botella o una placa de Petri. Las células generalmente producen material glicoproteico que permiten su adhesión a las superficies de cristal. La fina capa de células que se adhiere al vidrio o a la placa de Petri, denominada *monocapa*, se recubre con un medio de cultivo adecuado y el cultivo se incuba. El medio de cultivo usado para los cultivos celulares es bastante complejo, e incluye un número de aminoácidos y vitaminas, sales, glucosa y una capa de tampón bicarbonato. Para obtener un mejor crecimiento, generalmente es necesario la adición de una pequeña cantidad de suero sanguíneo, y también suelen añadirse varios antibióticos para prevenir la contaminación bacteriana. También se añade un indicador de pH coloreado para ayudar a detectar esta contaminación.

Algunos cultivos preparados de esta manera crecen indefinidamente y pueden constituir *líneas celulares permanentes*. Tales cultivos celulares son los más convenientes para la investigación vírica ya que suministran continuamente material para estos fines. En otros casos no ocurre crecimiento indefinido, pero el cultivo puede permanecer vivo durante algunos días. Tales cultivos, llamados *cultivos primarios*, pueden ser también útiles para la investigación, aunque haya que preparar nuevos cultivos a partir de material fresco de vez en cuando.

En algunos casos, no pueden obtenerse los cultivos celulares en monocapa, pero pueden cultivarse los órganos enteros o piezas de los mismos. Tales **cultivos de órganos** pueden ser útiles en la investigación vírica ya que permiten el crecimiento de los virus bajo condiciones de laboratorio más o menos controladas.

Existe entre virus y hospedador una mayor especificidad que la otorgada por el reino o *filum* al que pertenece el hospedador. En algunos casos, la especificidad es extrema; el virus puede ser capaz de infectar y/o multiplicarse en tan sólo una especie o subespecie, e incluso, a veces, en sólo algunos de los tejidos del hospedador. En otros casos, sin embargo, la especificidad es más amplia. Comentaremos algunas de las razones para esta especificidad en las siguientes secciones y en el Capítulo 16.

✓ 9.3 Revisión de conceptos

Los virus sólo pueden replicarse en ciertos tipos de células u organismos. Los virus de bacterias han demostrado ser modelos útiles ya que las células hospedadoras crecen y se manipulan fácilmente. Muchos virus de animales pueden crecer en células cultivadas.

- ✓ ¿Qué es un organismo hospedador?
- ✓ ¿Por qué es útil el uso de los cultivos celulares en la replicación vírica?

9.4 Cuantificación del virus

Para comprender en detalle la naturaleza de los virus y su replicación, se requiere poder *cuantificar* el número de partículas víricas. Los viriones son casi siempre muy pequeños para ser vistos al microscopio óptico. Aunque pueden ser observados al microscopio electrónico, la preparación de las muestras puede ser demasiado tediosa para ser utilizado rutinariamente para cuantificar. En general, los virus se cuantifican determinando sus efectos en las células hospedadoras que infectan. En este contexto, una *unidad vírica infecciosa* es la unidad más pequeña que causa un efecto detectable en un hospedador susceptible. Mediante la determinación del número de unidades infecciosas por volumen de fluido puede obtenerse una estimación de la cantidad de virus. Discutiremos aquí varios métodos para determinar la unidad infecciosa vírica, limitándonos a virus de bacterias y de animales.

Ensayo en placa

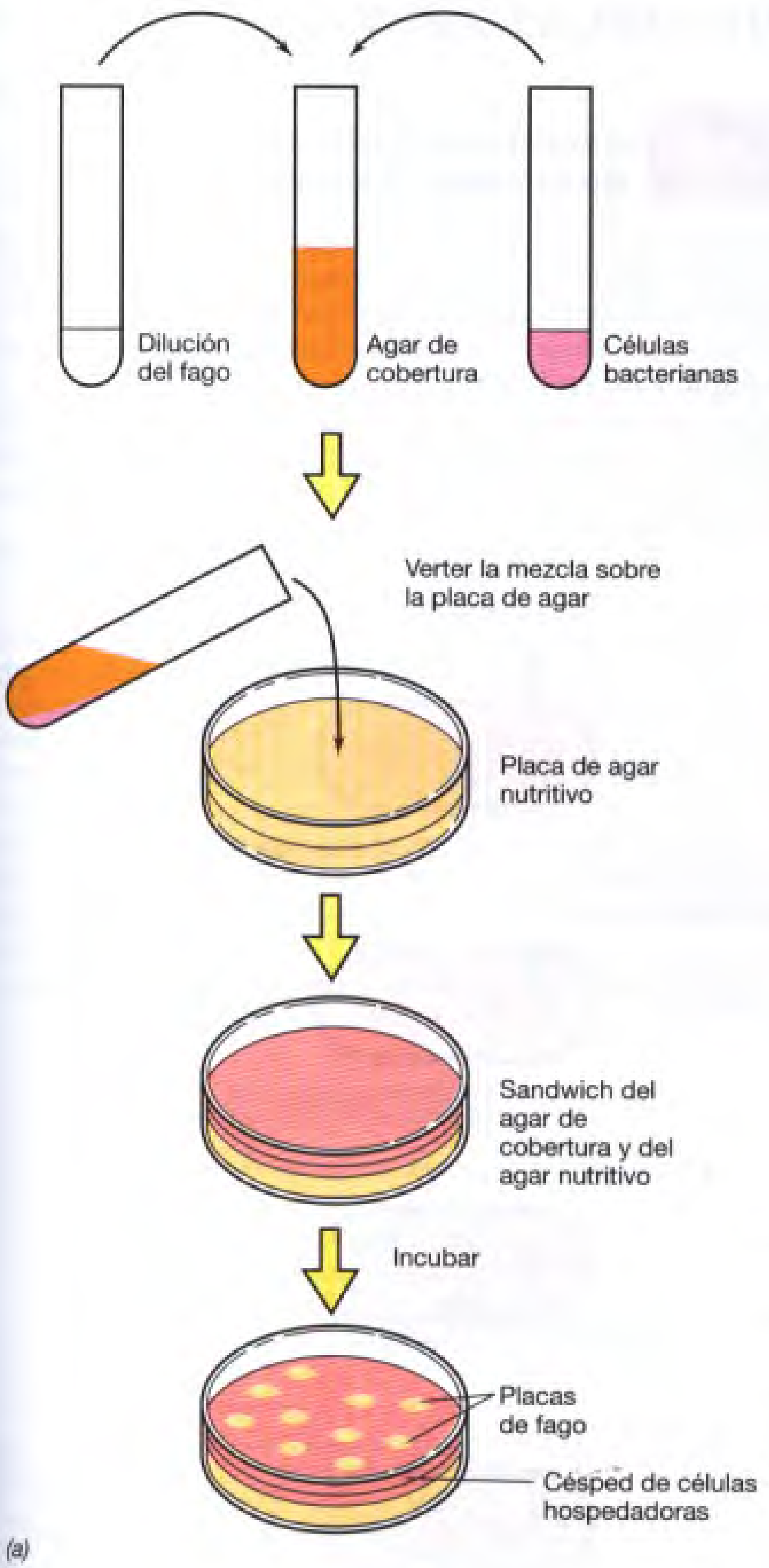
Cuando un virión inicia una infección en una capa o césped de células hospedadoras creciendo en una superficie plana, puede ocurrir una zona de *lisis* o una zona de *inhibición de crecimiento* que se traduce en la aparición de un área clara en el césped. Esta zona clara se llama **placa** o calva, y se asume que cada placa se ha originado a partir de la replicación de un único virión.

Las placas son esencialmente «agujeros» en un césped producido por un crecimiento celular confluente. Con virus bacterianos, pueden obtenerse placas cuando las partículas víricas se mezclan con la bacteria hospedadora y se extienden como una fina capa de agar blando que cubre la superficie de un medio de agar (Figura 9.6*a*). Durante la incubación del cultivo, la bacteria crece y forma una capa túrbida que es visible a simple vista. Sin embargo, allí donde se haya iniciado una infección, se produce lisis de las células, lo que resulta en la formación de una zona clara llamada *placa* o *calva* (Figura 9.6*b*).

El procedimiento del plaqueo también permite el aislamiento de cepas de virus puras ya que si una placa ha surgido de un virión único, todos los viriones de la placa son probablemente idénticos desde el punto de vista genético. Algunos de los viriones de esta placa pueden ser recogidos e inoculados en un cultivo bacteriano fresco para establecer una línea pura del virus. El desarrollo de la técnica del ensayo en placa fue tan importante para el avance de la virología como el desarrollo de los medios sólidos por Koch (*véase* Sección 1.5) para el de la bacteriología.

El ensayo en placa puede utilizarse para virus animales usando cultivos de células animales como sistema hospedador. Se prepara un cultivo en monocapa en una placa de Petri o botella plana y se extiende sobre ella la suspensión vírica. Las placas se visualizan como zonas de destrucción de las células animales (Figura 9.7).

En algunos casos, el virus puede no destruir la célula sino causar cambios en su morfología o velocidad de crecimiento que pueden ser reconocidos. Por ejemplo, los virus tumorales pueden no lisar las células pero las hacen crecer más rápidamente que las células no infectadas, un fenómeno llamado **transformación**. Como hemos señalado, las células en un cultivo de tejidos se ordenan formando una monocapa. Esto es debido a que el crecimiento se detiene cuando las células que están creciendo entran en contacto entre sí (un fenómeno conocido como *inhibición por contacto*). No obstante, las células transformadas tienen alterados sus requerimientos de crecimiento y continúan creciendo y apilándose para formar un *foco de crecimiento* (llamado *foco de infección* cuando la transformación se ha



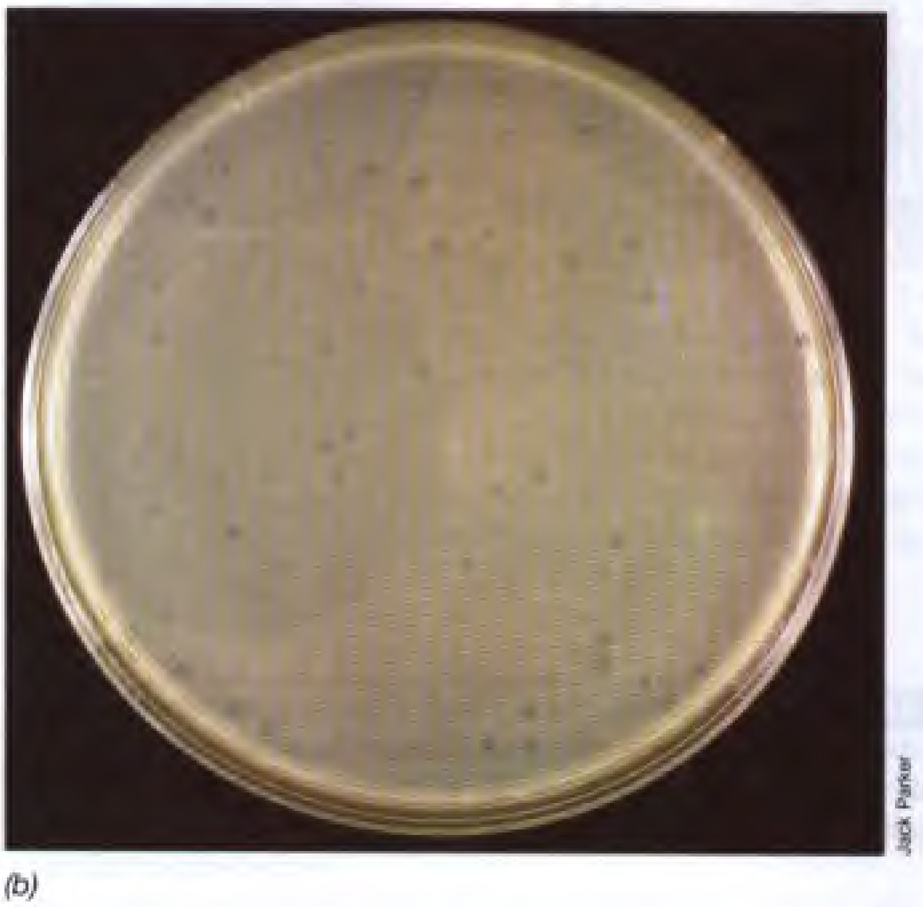


Figura 9.6 Cuantificación de virus de bacterias por el ensayo en placa utilizando la técnica del agar de cobertura. (a) Se mezcla una dilución de la suspensión del material que contiene el virus con una pequeña cantidad de agar fundido y con la bacteria hospedadora, y la mezcla se vierte sobre la superficie de una placa con agar nutritivo. La bacteria hospedadora, que se ha extendido uniformemente por la capa de agar de cobertura, comienza a crecer y forma, tras la incubación, un *césped* por crecimiento confluente. Cada partícula de virus que se fija a una célula y se multiplica puede causar lisis celular, y las partículas liberadas alcanzan a células adyacentes en el agar, las infectan, se reproducen y, de nuevo, producen lisis y liberación de más partículas. El tamaño de la placa depende del virus, del hospedador y de las condiciones de cultivo. (b) Fotografía de una placa mostrando las clavas formadas por un bacteriófago sobre un césped de una bacteria sensible. Las placas mostradas tienen 1-2 mm de diámetro.

originado por la infección vírica). Mediante la determinación del número de focos de infección, puede obtenerse una estimación del número de virus.

Eficiencia del cultivo en placa

Un importante concepto en virología cuantitativa es el de la *eficacia del cultivo en placa*. El número de partículas determinado en el ensayo en placa siempre es menor que el determinado por microscopía electrónica. La eficiencia con la que los viriones infectan las células rara vez es del 100% y, a menudo, es considerablemente menor. Esto no significa que los virus que no han infectado sean inactivos, aunque a veces éste pueda ser el caso. Simplemente significa que, bajo las condiciones usadas, no ha ocurrido una infección productiva con estas partículas. Aunque con los virus de bacterias la eficiencia del cultivo en placa es frecuentemente más alta del 50%, con muchos virus de animales puede ser muy baja, 0,1 ó 1%. No se sabe muy bien por qué las partículas víricas varían en infectividad. En algunos casos es posible que las condiciones usadas en la cuantificación no sean óptimas. Puesto que el microscopio electrónico no se utiliza rutinariamente para contar virus, es a veces difícil conocer la eficiencia del cultivo en placa, pero el concepto es importante, tanto en investigación básica como en la práctica médica. Puesto que la eficiencia del cultivo en placa rara vez se acerca al 100%, cuando se utiliza este método para cuantificar virus, es más preciso

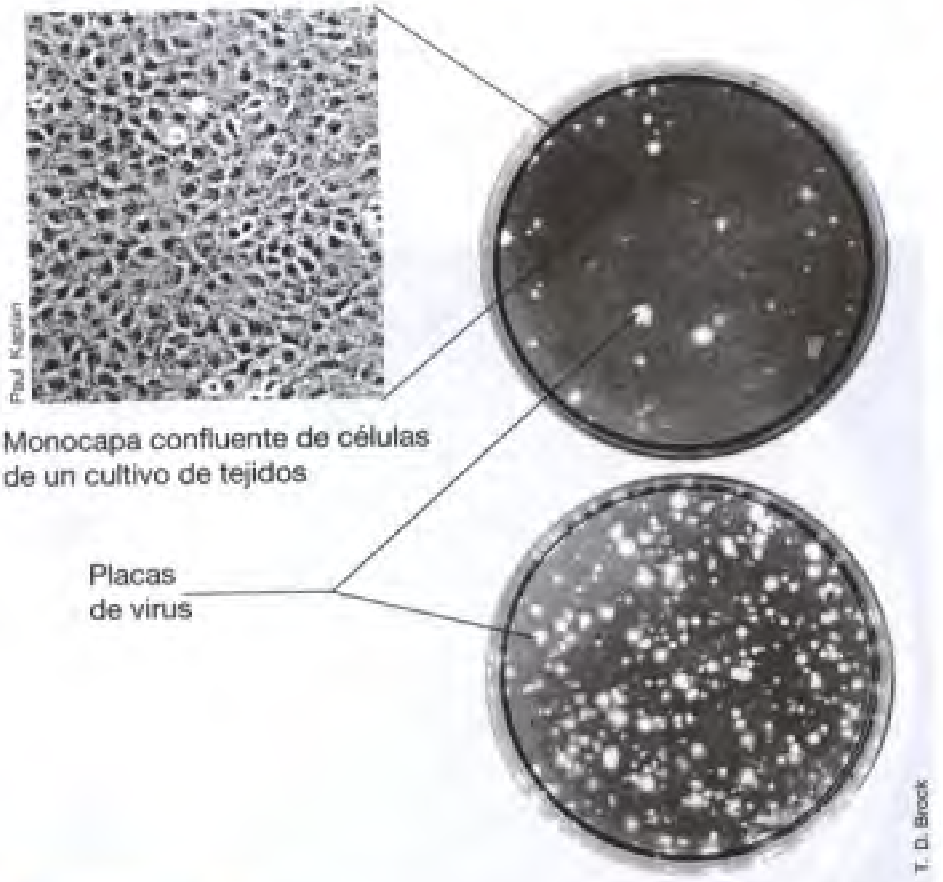

Paul Kaplan
Monocapa confluente de células de un cultivo de tejidos
Placas de virus
T. D. Brock

Figura 9.7 Cultivos celulares en monocapa sobre placas de Petri. Obsérvese la presencia de placas donde se ha producido la lisis celular mediada por el virus. También se muestra una micrografía de un cultivo celular.

expresar la concentración (denominada *título*) de la suspensión vírica como número de *unidades formadoras de placa* y no como un número absoluto de unidades de viriones.

Métodos de infectividad en animales

Algunos virus no causan efectos reconocibles en los cultivos celulares pero causan la muerte del animal entero. En tales casos, la cuantificación del virus puede realizarse por algún tipo de titulación en los animales infectados. El procedimiento general es realizar una serie de diluciones de una muestra desconocida (*véase* Sección 6.5), generalmente diluciones decimales, e inyectar muestras de cada dilución en un cierto número de animales sensibles. Después de un periodo de incubación adecuado, se tabula la fracción de animales vivos y muertos de cada dilución y se calcula la *dilución de punto final*. Ésta es la dilución a la que, por ejemplo, la *mitad* de los animales infectados mueren. Aunque estos métodos de dilución seriada son más tediosos y menos precisos que los de cultivo, pueden ser esenciales para estudiar ciertos tipos de virus.

✓ 9.4 *Revisión de conceptos*

Aunque se requiere un único virión para iniciar un ciclo infeccioso, no todas las partículas víricas son igualmente infecciosas. Uno de los métodos más precisos para medir la infectividad vírica es el ensayo en placa. Las placas de lisis son zonas claras que aparecen en la capa o césped de células hospedadoras, y cada placa se ha originado por la infección de una única partícula vírica. La placa de lisis del virus es análoga a la colonia bacteriana.

- ✓ Dé una definición de *eficiencia del cultivo en placa*.
- ✓ ¿Qué es una *unidad formadora de placa*?

III REPLICACIÓN VÍRICA

9.5 Características generales de la replicación vírica

La esencia de la replicación vírica puede ser definida de manera simple: el virus debe inducir a la célula hospedadora a sintetizar todos los componentes necesarios para fabricar más virus. Estos componentes deben luego ser ensamblados en la estructura apropiada, y los nuevos viriones deben escapar de la célula para infectar otras células. Las diferentes fases de este proceso de replicación en el caso de un bacteriófago pueden ser resumidas en cinco etapas (Figura 9.8).

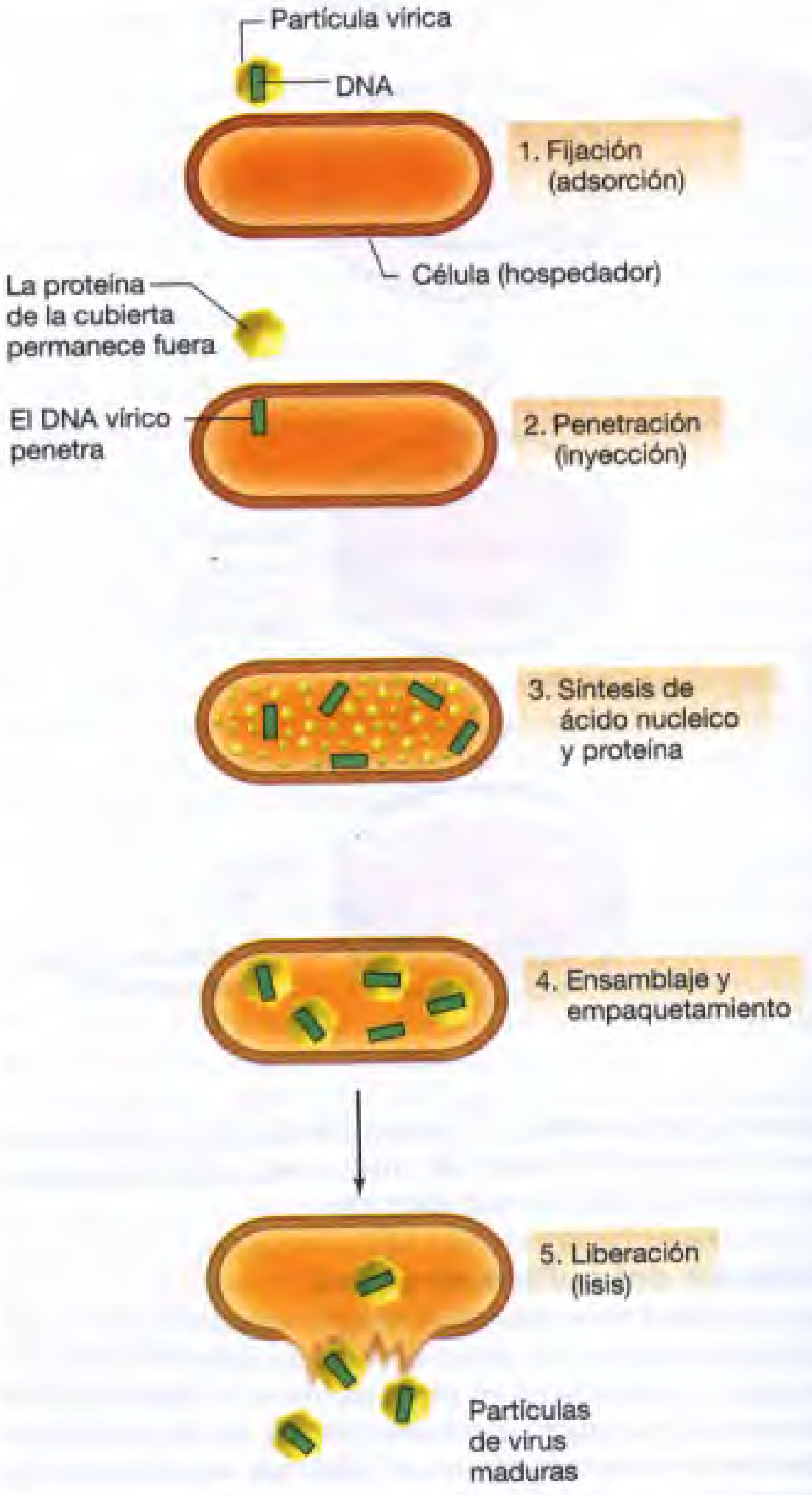

Partícula vírica
DNA
1. Fijación (adsorción)
Célula (hospedador)
La proteína de la cubierta permanece fuera
El DNA vírico penetra
2. Penetración (inyección)
3. Síntesis de ácido nucleico y proteína
4. Ensamblaje y empaquetamiento
5. Liberación (lisis)
Partículas de virus maduras

Figura 9.8 Ciclo replicativo de un virus bacteriano. Se indican las etapas generales de la replicación del virus.

1. *Unión* o *fijación* (adsorción) del virus a una célula hospedadora susceptible.
2. *Penetración* (inyección) del virión o de su ácido nucleico en la célula.
3. *Síntesis de ácido nucleico y proteína*; tiene lugar desde el comienzo hasta el final de la infección. Al principio, el virus redirige el metabolismo celular hacia la síntesis de ácido nucleico y proteínas víricas. Más tarde, se sintetizan proteínas estructurales que son componentes de la cubierta vírica.
4. *Ensamblaje* de las subunidades estructurales (y componentes de membrana en virus envueltos) y empaquetamiento del ácido nucleico para originar nuevas partículas víricas.
5. *Liberación* de los viriones maduros de la célula.

Estas etapas de la replicación vírica que se reconocen cuando las partículas víricas infectan células en cultivo se representan en la Figura 9.9, donde se muestra lo que se denomina **curva de crecimiento de una etapa**. En los primeros minutos tras la infección se dice que el virus sufre un *eclipse*. El ácido nucleico del virus se ha separado de su cubierta proteica, e incluso si la célula hospedadora se rompe, el virión no se puede recuperar como entidad infecciosa. Aunque el ácido nucleico del virus puede ser infeccioso, su infectividad es muchas veces menor que la del virión entero, ya que se ha perdido la maquinaria que introduce el genoma vírico en la célula. Además, fuera del virión, el ácido nucleico deja de estar protegido de las actividades dañinas del ambiente, como cuando estaba dentro de la cubierta.

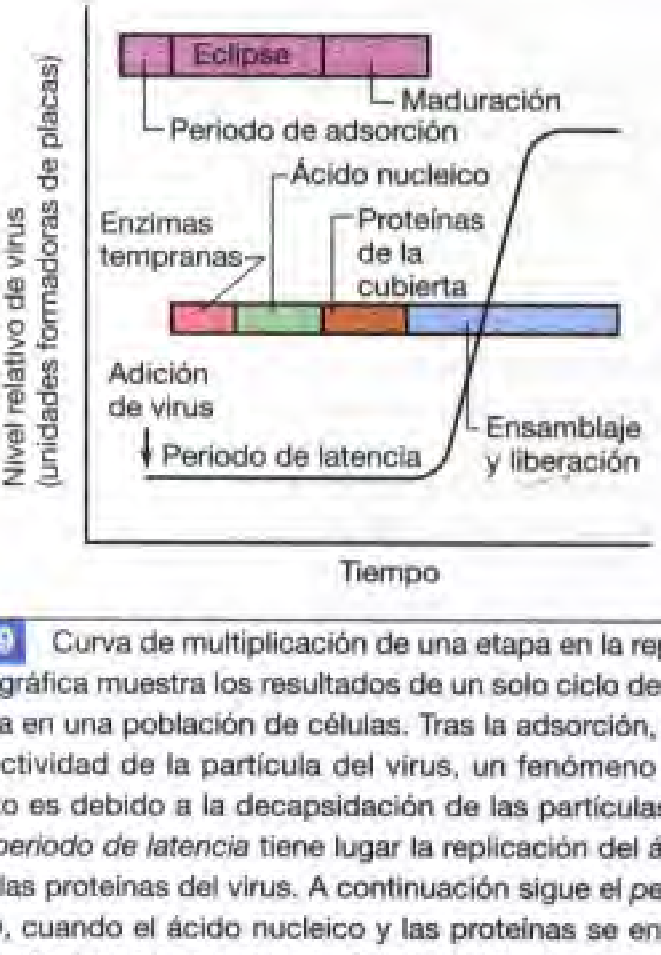


Figura 9.9 Curva de multiplicación de una etapa en la replicación vírica. Esta gráfica muestra los resultados de un solo ciclo de multiplicación vírica en una población de células. Tras la adsorción, desaparece la infectividad de la partícula del virus, un fenómeno llamado eclipse. Esto es debido a la decapsidación de las partículas víricas. Durante el *periodo de latencia* tiene lugar la replicación del ácido nucleico y de las proteínas del virus. A continuación sigue el *periodo de maduración*, cuando el ácido nucleico y las proteínas se ensamblan formando partículas víricas maduras. Si las células se rompen en esta fase, pueden detectarse virus activos. Finalmente, tiene lugar la *liberación*, con o sin lisis celular. La evolución temporal del ciclo de una etapa varía con el virus y con el hospedador. Compárese la descripción general y color de este esquema con los detalles específicos particulares de la replicación del bacteriófago T4 indicados en la Figura 9.15.

El eclipse ocurre durante los primeros estadios de la replicación vírica. La maduración comienza cuando las moléculas de ácido nucleico recién sintetizadas se empaquetan dentro de la proteína de la cubierta. Durante la fase de *maduración*, el título de viriones activos se incrementa dramáticamente. El periodo de tiempo en el que no existen viriones infecciosos fuera de la célula se denomina *periodo de latencia*. Al final de la maduración, ocurre la salida de los virus, bien como resultado de la *lisis* celular o mediante algún proceso de gemación o excreción. El número de viriones liberados, denominado *rendimiento vírico (burst size, tamaño de la explosión)*, varía con el tipo de virus y el tipo de célula hospedadora y puede fluctuar de unos pocos a varios miles. La duración del ciclo de replicación varía de 20-60 minutos en muchos virus de bacterias a 8-40 horas en la mayoría de los virus de animales. En las dos secciones siguientes, consideraremos más detalladamente las etapas del ciclo de replicación vírica.

✓ 9.5 Revisión de conceptos

El ciclo de vida de un virus puede ser dividido en cinco etapas: fijación (adsorción), penetración (inyección), síntesis de ácido nucleico y proteínas, ensamblaje y empaquetamiento, y liberación de nuevos virus.

✓ ¿Qué es el *empaquetamiento* en viriones?

✓ ¿A qué se refiere *eclipse*?

9.6 Etapas en la multiplicación vírica: fijación y penetración

En esta sección discutiremos con más detalle la fijación y penetración del virus, las primeras etapas de la multiplicación vírica. Además, consideraremos el mecanismo por el que algunas bacterias reaccionan a la penetración del DNA del bacteriófago.

Fijación

La interacción entre el virus y el hospedador se caracteriza por su alta especificidad. En general, esta especificidad se manifiesta a nivel del proceso de unión. La partícula del virus (desnudo o envuelto) tiene una o más proteínas de superficie que interaccionan con componentes específicos de la superficie de la célula llamados *receptores*. Los receptores de la superficie de la célula son componentes normales del hospedador, tales como proteínas, carbohidratos, glicoproteínas, lípidos, lipoproteínas, o complejos de éstos, a los que se une el virión. Los receptores llevan a cabo funciones normales de la célula. Por ejemplo, el receptor del bacteriófago T1 es una proteína del transporte de hierro y su correlativo del fago lambda está implicado en el transporte de maltosa. Los receptores de los virus de animales pueden incluir moléculas implicadas en el contacto célula a célula o en el sistema inmune.

Los virus que están estrechamente relacionados no comparten necesariamente receptores similares. Por ejemplo, el receptor del bacteriófago T2 es una proteína de membrana, mientras que el de su pariente cercano, el bacteriófago T4, es un componente polisacarídico de la cubierta externa de la célula (ver más abajo). Algunos receptores son reconocidos por varios virus diferentes.

Los receptores determinan qué células serán **susceptibles** de ser infectadas. En los organismos multicelulares, los receptores pueden ser expresados solamente por algunos tipos de células. El receptor del virus de la gripe es un azúcar específico, el ácido siálico, que se encuentra en posición terminal en un oligosacárido unido covalentemente a una proteína de membrana. Esta proteína se encuentra en muchos tipos celulares, incluyendo los hematíes, de manera que el virus de la gripe puede unirse a muchas células diferentes. Otros receptores se encuentran en algunos tipos de células, tales como la proteína CD4 encontrada sólo en ciertas células del sistema inmune y usada como receptor por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), lo que restringe los tipos de células que el VIH puede infectar.

En ausencia del receptor, el virus no puede adsorberse, y en consecuencia no puede infectar. Si el receptor se altera, el hospedador puede hacerse resistente a la infección vírica. Sin embargo, también pueden surgir mutantes del virus capaces de adsorberse a hospedadores resistentes. Además, algunos virus animales son capaces de utilizar más de un receptor, de manera que la pérdida de uno no impide generalmente la fijación.

Penetración

La unión de un virus a la célula origina cambios en el virus y/o en la célula que tienen lugar en la *penetración*. Los virus deben replicarse dentro de las células, y, por tanto, como mínimo el genoma vírico debe entrar en su interior. Sin embargo, ya mencionamos (*véase* Sección 9.2) que para que algunos virus se repliquen, algunas proteínas deben entrar también en la célula hospedadora. Es importante dejar claro que la fijación e incluso la penetración de una célula susceptible no conducirá a la multiplicación vírica si no puede leerse la información contenida en el genoma vírico. Una célula que permite la multiplicación de un virus se denomina **permisiva** para ese virus.

Diferentes virus tienen diferentes estrategias de penetración. En el caso de algunos virus de animales, el virus envuelto es decapsidado en la membrana plasmática, pero en muchos otros el virión entero entra en la célula por endocitosis. En tales casos, el virus debe ser posteriormente decapsidado (parcial o totalmente) para que el genoma tenga acceso a la célula y pueda replicarse. A veces, esta decapsidación tiene lugar en el citoplasma mientras que en otras se produce en la membrana nuclear.

Las células con paredes celulares, como las bacterianas, son infectadas de manera diferente a las células animales que carecen de pared celular. Los mecanismos de penetración más complicados se han encontrado en los virus que infectan bacterias. El bacteriófago T4, que infecta a *Escherichia coli*, puede utilizarse como un ejemplo.

La estructura del bacteriófago T4 se mostró en la Figura 9.5*b*. El virión tiene una **cabeza**, en cuyo interior se encuentra el DNA plegado, y una larga y compleja **cola**, en cuyo extremo hay una serie de fibras de la cola. Durante el proceso de unión, los viriones se unen primero a las células por medio de las fibras de la cola (Figura 9.10). Los extremos de las fibras interactúan específicamente con estructuras polisacarídicas que forman parte de la membrana externa de la pared celular de Gram negativas (*véase* Sección 4.8). Estas fibras entonces se retraen, y el núcleo de la cola contacta con la pared celular de la bacteria. La acción de la lisozima origina la formación de un agujero. La vaina de la cola se contrae, y el DNA del virus pasa dentro de la célula a través de un orificio en el extremo de la cola, permaneciendo la mayoría de la cubierta proteica en el exterior.

Restricción vírica y modificación por el hospedador

A menudo, los animales multicelulares pueden enfrentarse y eliminar a los virus invasores por una variedad de mecanismos de defensa antes de que la infección se extienda, o a veces antes de que el virus penetre en la célula diana. Discutiremos estos mecanismos en los Capítulos 21 y 22. Los procariotas no poseen estas defensas. Mientras las extremadamente gruesas paredes celulares de hongos y plantas también proporcionan alguna protección, las relativamente más finas paredes celulares de procariotas protegen mucho menos. Los procariotas han desarrollado, sin embargo, resistencia a virus.

Ya hemos visto que una de las formas de resistencia del hospedador a los virus deriva de la inexistencia del receptor de superficie al que el virus puede unirse. En procariotas, existe otro tipo de resistencia del hospedador más específico que implica la destrucción del DNA genómico bicatenario del virus después de que éste haya sido inyectado. Esta destrucción la llevan a cabo enzimas del hospedador que cortan el DNA vírico en uno o varios sitios, evitando así su replicación. Este fenómeno se denomina **restricción** y es parte de un mecanismo general del hospedador para evitar la invasión por ácidos nucleicos extraños.

Las enzimas que destruyen el DNA se denominan *endonucleasas de restricción* o más comúnmente *enzimas de restricción*. Las enzimas de restricción son altamente específicas y atacan sólo ciertas secuencias (generalmente cuatro a seis pares de bases). Para que estos sistemas sean efectivos, el hospedador debe tener un mecanismo de protección de su propio DNA. Esto se consigue por **modificación** específica del DNA en los sitios donde actúan las enzimas de restricción. La modificación del DNA del hospedador se realiza por metilación de las bases púricas o pirimídicas (de tal manera que sus propiedades de apareamiento no se alteran). El DNA es modificado usualmente en unas bases específicas de cada banda. Durante la replicación semiconservativa (*véase* Sección 7.5) habrá un periodo durante el cual sólo la banda del DNA molde estará modificada. Un sistema enzimático de restricción/modificación reconoce a este DNA como molécula que necesita modificación adicional en lugar de como DNA que debe ser restringido.

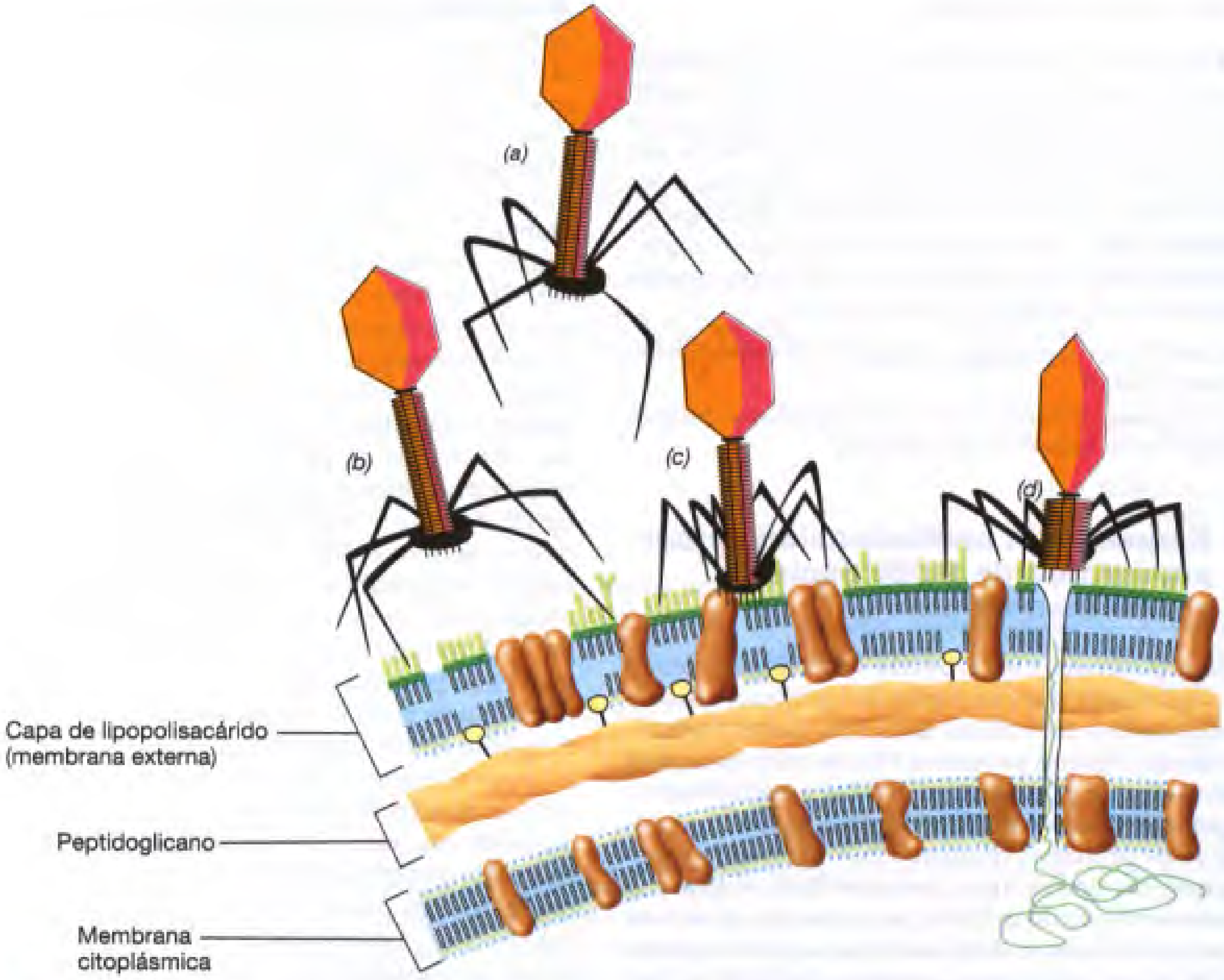


Figura 9.10 Fijación de la partícula del bacteriófago T4 a la pared celular de *Escherichia coli* e inyección del DNA. (a) Partícula no fijada. (b) Fijación a la pared por fibras de la cola interaccionando con el polisacárido. (c) Contacto entre la pared celular y las espículas de la cola. (d) Contracción de la vaina de la cola e inyección del DNA. Para una descripción detallada de la pared celular de Gram negativa, *véase* Sección 4.9.

Las enzimas de restricción son específicas para DNA bicatenario, y los bacteriófagos que contienen este tipo de DNA son bastante abundantes. En consecuencia, las enzimas de restricción están también ampliamente distribuidas en procariotas. Analizaremos el importante uso práctico de las enzimas de restricción en genética e ingeniería genética más adelante (*véase* Sección 10.13 y Capítulo 13).

Algunos virus pueden superar los mecanismos de restricción del hospedador por modificaciones en su ácido nucleico que, de esta manera, deja de ser susceptible al ataque enzimático. Se han reconocido dos tipos de modificaciones químicas del DNA vírico: *glucosilación* y *metilación*. Por ejemplo, los bacteriófagos T-par (T2, T4 y T6) tienen su DNA glicosilado en diferentes grados, y la glucosilación previene o reduce ampliamente el ataque por las endonucleasas. Se han encontrado muchos otros ácidos nucleicos víricos que son modificados por metilación, pero la glucosilación sólo se ha encontrado en los bacteriófagos T-par. Debemos enfatizar que la modificación del ácido nucleico vírico ocurre después de que ha tenido lugar la replicación. Otros virus, tal como los bacteriófagos T3 y T7, evitan la restricción codificando proteínas que inhiben los sistemas de restricción del hospedador. Algunos hospedadores tienen múltiples sistemas de restricción y metilación que ayudan a evitar la infección de aquellos virus que pueden superar sólo uno de ellos.

Sin embargo, no todos los sistemas de restricción reconocen DNA no modificado. Se conocen sistemas de restricción que ¡sólo actúan sobre DNA *modificado*! Claramente, el hospedador que contiene esta enzima no contiene la enzima modificadora. Sin embargo, este hospedador resulta protegido de la infección por un virus que fue modificado durante su reproducción previa en otra cepa del hospedador.

Los hospedadores también contienen otras metilasas de DNA además de las implicadas en su protección frente a sus propias enzimas de restricción. Algunas de estas metilasas pueden estar implicadas en la reparación de DNA o en la regulación génica, pero otras pueden ofrecer protección al DNA del hospedador. Esto es debido a que *algunos virus codifican sus propias enzimas de restricción.*

✓ 9.6 Revisión de conceptos

La unión de un virión a la célula hospedadora es un proceso altamente específico que implica la interacción de proteínas presentes en la superficie de la partícula vírica con receptores de superficie de una célula hospedadora susceptible. Sólo después de que la fijación se haya producido, puede el genoma vírico penetrar en la célula hospedadora. La resistencia del hospedador a la infección vírica puede producirse de diversas maneras. Los procariotas pueden tener sistemas de restricción/modificación que reconocen y destruyen DNA extraño.

- ✓ ¿Cómo contribuye el proceso de fijación a la especificidad virus/hospedador?
- ✓ ¿Por qué algunos virus necesitan ser decapsidados después de la penetración mientras que otros no?

9.7 Etapas en la multiplicación vírica: producción de ácido nucleico y proteínas víricas

Para que la replicación vírica pueda tener lugar, deben surgir por replicación nuevas copias del genoma vírico y sintetizarse proteínas específicas del virus. Generalmente, la producción de algunas proteínas víricas comienza muy poco después de que el genoma vírico haya entrado en la célula hospedadora (si no requiere decapsidación). La producción de estas proteínas requiere RNA mensajero específico del virus. En ciertos tipos de virus RNA, el genoma mismo puede servir como mRNA. Sin embargo, en el caso de la mayoría de los virus, debe sintetizarse primeramente mRNA. Muchos virus tienen genomas de DNA bicatenario (como el de la célula hospedadora) y ya hemos comentado las características de la producción de mRNA a partir de DNA bicatenario (*véanse* Secciones 7.8 y 7.11).

Sin embargo, un gran número de virus tienen otros tipos de genomas, y estos incluyen no sólo DNA monocatenario sino RNA, tanto monocatenario como bicatenario. Además, hemos mencionado que algunos virus tienen un tipo de ácido nucleico en el virión pero usan otro como intermediario replicativo. Todos estos genomas «inusuales» presentan problemas a la hora de la multiplicación vírica, ya que implican transferencia de información, tal como RNA a RNA o RNA a DNA, que no realizan las enzimas del hospedador.

Esquemas de replicación vírica

El virólogo David Baltimore, uno de los galardonados con el Premio Nobel de Medicina en 1975 por el descubrimiento de los retrovirus y de la transcriptasa reversa, desarrolló un esquema de clasificación de virus basada principalmente en la relación entre el genoma vírico y su mRNA. En el esquema de la clasificación de Baltimore (Tabla 9.2), los virus con DNA bicatenario (ds del inglés *double stranded*) están en la Clase I. La producción del mRNA de tales virus puede producirse de igual manera que en el hospedador, aunque virus diferentes usan diversas estrategias para asegurar que el mRNA vírico es sintetizado preferentemente respecto al mRNA del hospedador. La Clase II agrupa virus con DNA monocatenario (ss). Antes de que pueda sintetizarse el mRNA de estos virus, debe sintetizarse una banda complementaria de DNA, ya que la RNA polimerasa usa DNA bicatenario (*véanse* Secciones 7.8 y 7.9). Estos virus usan un DNA bicatenario durante su replicación, y este intermediario es usado para la transcripción (Figura 9.11). La síntesis del dsDNA intermediario y la transcripción posterior se lleva a cabo por enzimas celulares (aunque puedan participar algunas proteínas víricas). La situación es totalmente diferente en los virus con genomas RNA (Clases III-VI).

Antes de que veamos con más detalle, se necesita algún tipo de nomenclatura relativa a la orientación de la banda de ácido nucleico. Recuérdese que el mRNA es complementario a la banda de DNA que fue usada como molde y que el mRNA puede ser traducido a proteína (*véase* Capítulo 7). Por convención, el mRNA se considera que presenta la configuración de tipo *más* o *positiva* (+). Su complementaria estará en la configuración *menos* o *negativa* (−). Esta nomenclatura puede utilizarse para describir la orientación de cualquier virus monocatenario (RNA o DNA) pero se usa principalmente para los virus RNA. Un virus que tiene un genoma de RNA monocatenario con la misma orientación que su mRNA se considera un virus *RNA con cadena positiva*. Un virus cuyo genoma de RNA monocatenario es complementario a su RNA se dice que es un virus *RNA con cadena negativa* (Nótese que positivo y negativo no son términos absolutos, sino que se usan en relación al mRNA del virus.)

Debe considerarse, además, que las RNA polimerasas celulares no catalizan generalmente la formación de RNA

TABLA 9.2 El sistema de clasificación de virus de Baltimore

Clase	Descripción del genoma y estrategia de replicación	Ejemplos	
		Virus bacterianos	Virus animales
I	Genoma DNA bicatenario	Lambda, T4	Herpesvirus, pox virus
II	Genoma DNA monocatenario	ϕX174	Virus de la anemia del pollo
III	Genoma RNA bicatenario	ϕ6	Reovirus (*véase* Sección 16.9)
IV	Genoma RNA monocatenario, sentido más	MS2	Poliovirus
V	Genoma RNA monocatenario, sentido menos		Virus de la gripe, virus de la rabia
VI	Genoma RNA monocatenario que se replica a través de un intermediario de DNA		Retrovirus
VII	Genoma DNA bicatenario que se replica a través de un intermediario de RNA		Virus de la hepatitis B

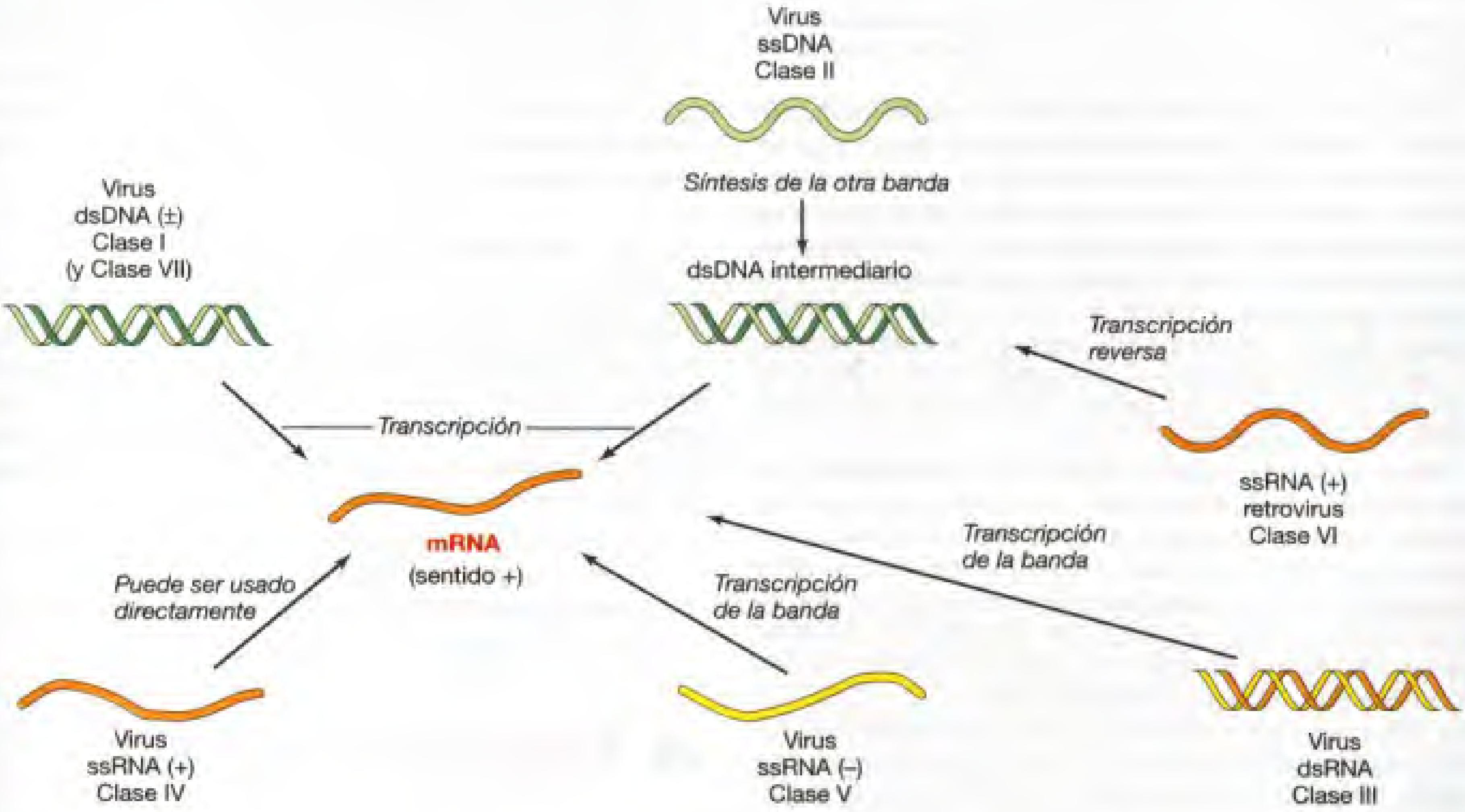


Figura 9.11 Formación de mRNA después de la infección de las células por virus de diferentes tipos. La polaridad del mRNA se considera positiva (+). El sentido de los diferentes ácidos nucleicos víricos se indica como + si es el mismo que el del mRNA, como − si es opuesto, y ± si es bicatenario. Casi todos los virus con DNA monocatenario son de polaridad +, aunque en algunos casos pueden empaquetarse tanto la banda + como la banda −. No está claro si una partícula con la banda − es infecciosa. Las diferentes clases de virus de la clasificación de Baltimore se muestran en la Tabla 9.2.

a partir de un RNA molde, sino que requieren un molde de DNA. Por tanto, los virus RNA requieren una RNA polimerasa específica dependiente de RNA. Consideremos este requerimiento desde el punto de vista de los tipos de virus con genomas RNA. El caso más simple lo representan los virus con cadena de RNA *positiva* (Clase IV) donde la cadena de RNA vírico que penetra es la cadena positiva y, por tanto, sirve directamente como mRNA. Además de las otras proteínas requeridas, este mRNA codifica para la RNA polimerasa específica del virus. Esta polimerasa primero hace cadenas negativas complementarias y luego las utiliza como templados para hacer más cadenas positivas. La situación es más complicada en el caso de los virus RNA con cadena negativa (Clase V)(cuyos viriones contienen solamente la banda negativa) o de los virus con RNA bicatenario (Clase III). En ningún caso, el RNA que penetra sirve como mRNA, y, por tanto, este mRNA debe sintetizarse en primer lugar. Sin embargo, como mencionamos anteriormente, las células no tienen por lo general una RNA polimerasa capaz de hacer esto. Para resolver este problema, estos virus contienen algunas moléculas de esta enzima en sus viriones, y son inyectadas en la célula junto con el RNA genómico. Por tanto, en estos casos, la cadena más complementaria se sintetiza por esta RNA polimerasa dependiente de RNA y usada como mensajero.

Los retrovirus (agentes causales de ciertos tipos de cánceres y del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida, SIDA) son virus RNA que se replican a través de un intermediario (Clase VI). El proceso de copiar la información presente en el RNA al DNA se llama **transcripción reversa**, y por tanto, estos virus requieren una enzima llamada **transcriptasa reversa**. (La telomerasa es un tipo de transcriptasa reversa; *véase* Sección 7.7.) Aunque la cadena de RNA retrovírico que penetra es la cadena positiva, no se utiliza como mensajero, y, en consecuencia, estos virus deben llevar transcriptasa reversa en sus viriones. Después de la infección, el RNA monocatenario ssRNA (ss, de *single stranded*) del virión es copiado a DNA bicatenario (a través de un intermediario de ssDNA), y el dsDNA sirve entonces como templado para la síntesis de mRNA (por tanto, ssRNA → ssDNA → dsDNA). Otra clase de virus, la Clase VII, incluye virus que tienen DNA bicatenario en sus viriones pero se replican a través de un intermediario de RNA, y, por tanto, también usan la transcriptasa reversa (*véase* Sección 16.14). La estrategia usada por estos virus para producir mRNA es la misma que la de los virus de la Clase I (Figura 9.11).

Aunque pueda parecer que esto cubre todas las posibilidades, se conocen virus que tienen un genoma de RNA de cadena sencilla, con una mitad en la orientación positiva (que puede usarse como mRNA) y la otra en orientación negativa. A partir de esta última, debe sintetizarse una cadena complementaria antes de que los genes puedan ser traducidos. Tales virus se llaman *ambivirus*.

Aunque esta discusión trata principalmente de la formación de mRNA, parte de la información vírico está relacionada con la replicación del propio genoma (*véase* también Figura 9.11). Sin embargo, algunas veces los virus usan estrategias de replicación complicadas que pueden no ser deducibles de la simple consideración del tipo de genoma que tenga el virus o cómo produce el mRNA. Algunas de estas estrategias de replicación serán abordadas con mayor profundidad más adelante en el presente capítulo, así como en el Capítulo 16, cuando nos ocupemos de virus específicos

Debe quedar claro que la Figura 9.11 da una visión general simplificada de situaciones a menudo complejas. Por ejemplo, aunque algunos virus pueden ser bastante pequeños, casi todos codifican varias proteínas funcionales. Esto puede presentar complejidades adicionales en los virus de animales (o de plantas) con genomas de RNA no segmentado, ya que los ribosomas eucarióticos no pueden leer mRNA policistrónico (*véanse* Secciones 7.11 y 7.15). Los virus RNA con cadena positiva que infectan eucariotas superan esta dificultad utilizando diferentes estrategias. Por ejemplo, los poliovirus traducen el mRNA en una gran poliproteína que luego cortan para originar los diferentes productos funcionales (*véase* Sección 16.7). Los virus RNA con cadena negativa, normalmente producen mRNAs subgenómicos, es decir, se sintetizan cadenas positivas cortas que codifican proteínas individuales. Por supuesto, debe sintetizarse también una cadena positiva completa como parte de la replicación del genoma.

Proteínas víricas

Una vez sintetizado el mRNA, pueden sintetizarse las proteína víricas (por ejemplo, enzimas y subunidades estructurales). Las proteínas sintetizadas como resultado de la infección vírica pueden agruparse en dos amplias categorías:

1. Proteínas (normalmente enzimas) sintetizadas inmediatamente después de la infección, llamadas **proteínas tempranas**, que son necesarias para la replicación del ácido nucleico vírico
2. Proteínas sintetizadas más tarde, llamadas **proteínas tardías**, que incluyen las proteínas de la cubierta del virus

Por lo general, tanto la cantidad de proteínas víricas como el momento de su aparición son objeto de regulación. Las proteínas tempranas son enzimas que, dada su acción catalítica, se sintetizan en pequeñas cantidades, mientras que las proteínas tardías, en su mayoría estructurales, se fabrican en cantidades muy superiores.

La infección vírica altera los mecanismos reguladores del hospedador significando una marcada sobreproducción de ácido nucleico y proteínas víricas en la célula infectada. En algunos casos, la infección vírica detiene completamente la síntesis macromolecular del hospedador, mientras que en otros la síntesis del hospedador continúa en paralelo con la síntesis vírica. En cualquier caso, la regulación de la síntesis vírica está más bajo el control del virus que del hospedador. Varios elementos de este control son similares a los mecanismos regulatorios del hospedador discutidos en el Capítulo 8, pero existen también otros mecanismos regulatorios exclusivos del virus. Más adelante en el presente capítulo, cuando consideremos los virus de animales, discutiremos algunos de estos mecanismos regulatorios.

✓ 9.7 Revisión de conceptos

A menudo se necesitan nuevas proteínas víricas antes de que tenga lugar la replicación vírica. Dichas proteínas están codificadas por moléculas de RNA mensajero sintetizadas a partir del genoma vírico. En algunos virus RNA, el propio RNA vírico actúa como mRNA. En otros, el genoma del virus sirve de molde para la formación de mRNA vírico y el virión contiene ciertas enzimas esenciales del virus.

✓ ¿Por qué algunos tipos de virus contienen enzimas en el virión para producir mRNA?

✓ Distinga entre un virus RNA con cadena positiva y un virus RNA con cadena negativa.

IV DIVERSIDAD VÍRICA

9.8 Generalidades de virus de bacterias

Los virus de bacterias, también llamados virus bacterianos, bacteriófagos o fagos, son muy diversos. En la Figura 9.12 se ilustran varios tipos de virus de bacterias. La mayoría de estos virus que se han estudiado en detalle infectan *Bacteria* del grupo entérico, tal como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Sin embargo, se conocen virus que infectan a diversos procariotas, tanto *Bacteria* como *Archaea*, y como hemos mencionado, el virus con el mayor genoma conocido, el bacteriófago G (de gigante), infecta a *Bacillus megaterium* (*véase* Sección 9.2). La mayoría de los bacteriófagos mejor estudiados contienen genomas con DNA bicatenario, y se cree que este tipo de bacteriófago es el tipo más común en la naturaleza. Sin embargo, se conocen muchos tipos, incluyendo los que poseen genomas con RNA de cadena sencilla, con RNA de doble cadena segmentados, y con DNA de cadena sencilla.

Muchos virus de bacterias tienen envolturas lipídicas pero la mayoría carecen de ellas. Sin embargo, muchos virus bacterianos son estructuralmente complejos. Todos los ejemplos de bacteriófagos con genomas de DNA bicatenario mostrados en la Figura 9.12 tienen colas. Las colas de los bacteriófagos T2, T4 y Mu son contráctiles y están implicadas en la penetración del ácido nucleico en el hospedador (Figura 9.10). La cola del bacteriófago lambda es flexible.

Aunque estos virus bacterianos fueron estudiados primero como sistemas modelo para entender las características generales de la multiplicación vírica, algunos se utilizan ahora como herramientas muy útiles en ingeniería genética (discutido en el Capítulo 31). Así, la información sobre virus bacterianos no es sólo útil como

Aprendiendo del pasado... El grupo del fago

Históricamente, los fagos de la serie T-par suministraron el material de estudio para la investigación inicial del «Grupo del fago», un grupo de investigadores de varias universidades e instituciones de investigación que pasaba sus veranos en el Laboratorio de Cold Spring Harbor en Long Island. Los miembros clave del Grupo del fago, Max Delbrück, Salvador Luria y A. D. Herohey, posteriormente compartieron el Premio Novel por su trabajo pionero. Entre los conceptos más importantes descubiertos inicialmente a partir de la investigación sobre los fagos de la serie T-par están: durante la infección, sólo penetra el ácido nucleico del virus en la célula (un descubrimiento que suministró evidencia a la hipótesis de que el DNA es el material genético); la existencia de recombinación genética en los virus; el fenómeno de restricción y modificación (que condujo al descubrimiento de las enzimas de restricción, tan importantes en ingeniería genética); la presencia en los virus de funciones únicas codificadas por genes víricos; la distinción entre funciones virales tempranas y tardías. Las primeras ideas acerca de la destrucción de las células hospedadoras por los virus también surgieron de la investigación de los fagos T-par. La decisión de elegir a los fagos T-par como sistemas modelo y concentrar el trabajo en ellos fue en gran medida responsable del notable éxito del Grupo del fago. ■

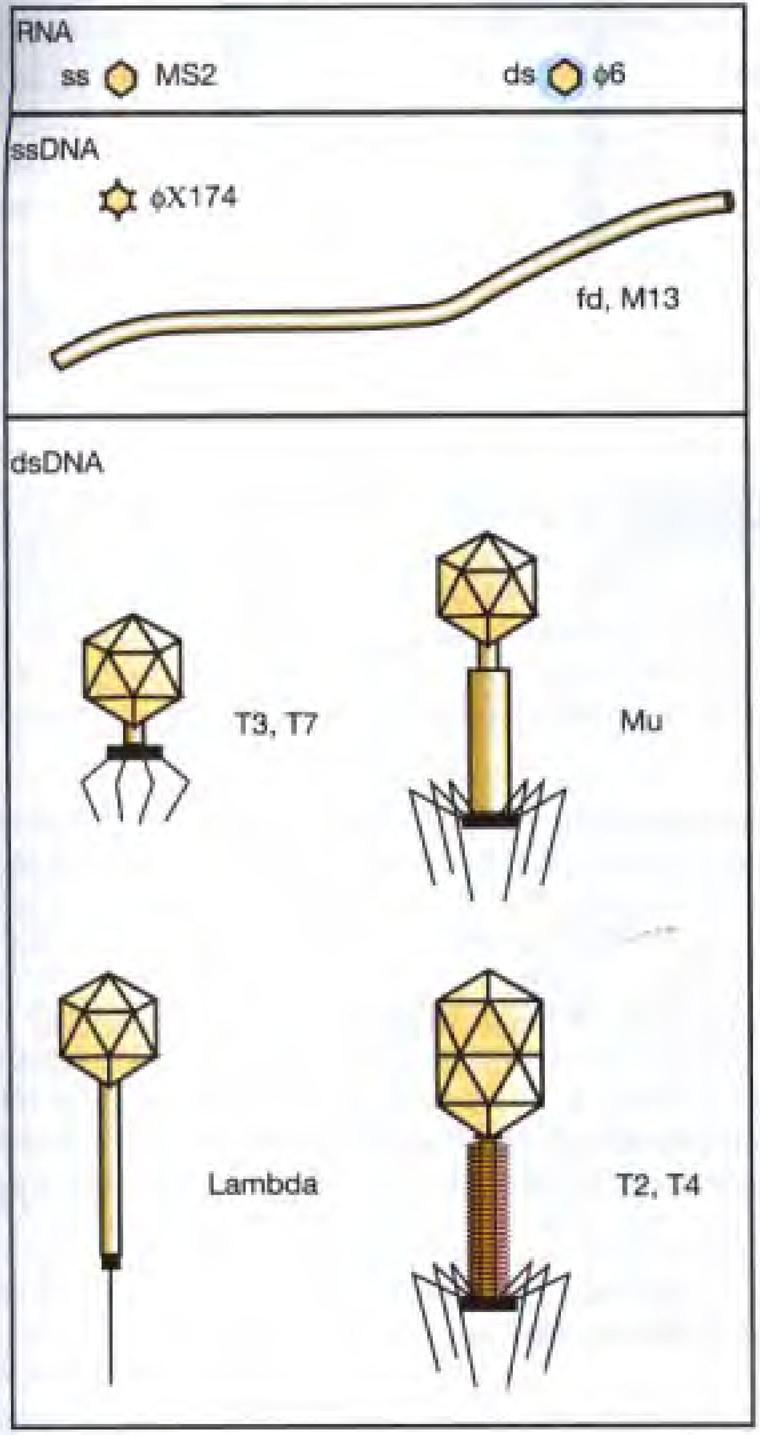


Figura 9.12 Representación esquemática de los principales tipos de virus. Los comentados en detalle son M13, φX174, MS2, T4, lambda, T7 y Mu. Los tamaños son a escala similar. La nucleocápsida del φ6 es aproximada.

introducción a la discusión sobre virus de animales, sino también esencial para comprender los conceptos presentados en los capítulos sobre genética microbiana (*véase* Capítulo 10) e ingeniería genética (*véase* Capítulo 31).

En las dos secciones siguientes de este capítulo examinaremos brevemente dos tipos diferentes de ciclos de vida vírico: **virulento** y **temperado**. Los virus virulentos lisan o matan a sus hospedadores tras la infección, mientras los virus temperados son capaces de adquirir una situación en la que su genoma se replica junto al del hospedador, al que, por tanto, no destruyen.

✓ 9.8 Revisión de conceptos

Los virus de bacterias, o bacteriófagos, son muy diversos. Los bacteriófagos mejor estudiados infectan *Bacteria* entéricas tal como *Escherichia coli* y son estructuralmente bastante complejos.

- ✓ ¿Qué tipo de genoma se considera como el más común en los bacteriófagos?

9.9 Bacteriófagos virulentos: T4

Como hemos mencionado, un virus virulento es un virus cuyo ciclo replicativo resulta en la destrucción de la célula, generalmente por lisis celular. Los primeros virus que se estudiaron en detalle fueron un conjunto de bacteriófagos con genomas de DNA bicatenario lineal que infectan a *Escherichia coli* y a un número de *Bacteria* relacionadas. Un grupo de científicos comenzó a estudiar estos virus como sistemas modelo y a utilizarlos para establecer muchos de los principios fundamentales de biología molecular y genética (*véase* el cuadro, «El Grupo del fago»). Estos fagos recibieron las denominaciones de T1, T2, y así sucesivamente hasta T7. Ya hemos mencionado brevemente en este capítulo cómo uno de estos virus, T4, se fija al hospedador y cómo su DNA penetra dentro del mismo (*véase* Sección 9.6 y Figura 9.10). En esta sección analizaremos con más detalle este virus para ilustrar el ciclo de replicación de los virus virulentos.

Los bacteriófagos T2, T4 y T6 están estrechamente relacionados, pero el T4 es el más estudiado. El virión del fago T4 es estructuralmente complejo (*véase* Figura 9.5*b*). Consiste de una cabeza icosaédrica cuyas dimensiones globales son 85 × 110 nm. Esta cabeza está unida a una cola compleja que consta de un tubo helicoidal (25 × 110 nm) a la cual se añaden una vaina, un «cuello» de conexión con un «collar», y una compleja placa basal donde se fijan las fibras de la cola (*véase* Figura 9.5*b*). En conjunto, la partícula del virus tiene más de 25 tipos distintos de proteínas.

El genoma del T4 es una molécula lineal de DNA bicatenario de 168.903 pares de bases, que codifica más de 250 proteínas; aunque no se conoce ningún virus que codifique su propio aparato transduccional, el T4 codifica varios tRNAs diferentes.

Aunque está bien determinado que el genoma del T4 tiene una secuencia lineal única, la secuencia del genoma de un virión individual difiere de la secuencia que uno encontraría en otro virión. Primero, la comparación de las secuencias de varios viriones T4 muestra que el DNA está *circularmente permutado*. Las moléculas que están relacionadas mediante permutaciones circulares parecen provenir de un círculo que es cortado, pero en cada caso el corte se produce en un lugar diferente. Además, el DNA de cada virión tiene secuencias repetidas en cada extremo (*repeticiones terminales*) de aproximadamente 3000 a 6000 pares de bases. El mecanismo de empaquetamiento del DNA del T4 implica cortar el DNA de una molécula de DNA larga que contiene varios equivalentes del genoma unidos por los extremos, una molécula conocida como *concatémero* (Figura 9.13). Este concatémero se corta una vez que la cabeza está llena, y no en una secuencia específica. Puesto que la cabeza del T4 admite algo más que un genoma completo, el mecanismo de llenar cabezas conduce a la permutación circular y a la redundancia terminal. La permutación circular origina la interesante situación de que aunque el genoma del T4 es lineal, el mapa genético de este organismo es circular. El DNA del T4 contiene la base modificada 5-hidroximetilcitosina en vez de citosina (Figura 9.14). Éste es el residuo que es glucosilado (*véase* Sección 9.6), y el DNA con esta modificación es virtualmente resistente a todas las enzimas de restricción conocidas; por tanto, el DNA que penetra está bien protegido de las defensas del hospedador.

Acontecimientos durante la infección del T4

Al comienzo de la infección, el T4 debe dirigir la síntesis de RNA, y luego de proteínas, desde su propio genoma y también replicar un DNA que contiene una base que no se encuentra en el genoma del hospedador. Un minuto después de la fijación y penetración, ha cesado la síntesis del DNA, RNA y proteínas del hospedador, pero ha comenzado la transcripción de ciertos genes del fago. La traducción de estas proteínas comienza poco después, y a los cuatro minutos ha comenzado la replicación del DNA del fago. La sucesión temporal de estos sucesos durante la infección del T4 se muestra en la Figura 9.15.

En su conjunto, los genes del T4 pueden dividirse en tres grupos, que codifican las proteínas tempranas, intermedias y tardías, respectivamente (Figura 9.15). Las **proteínas tempranas** y **medianas** son enzimas implicadas en la síntesis del DNA y en la transcripción. Las **proteínas tardías** son las proteínas de la cabeza y de la cola, y enzimas relacionadas con la liberación de las partículas de fagos maduros de la célula.

Aunque el T4 tiene un genoma muy grande, no codifica su propia RNA polimerasa. El control de la síntesis de mRNA implica la producción de proteínas que modifican secuencialmente la especificidad de la RNA polimerasa del hospedador a fin de que reconozca los diferentes promo-

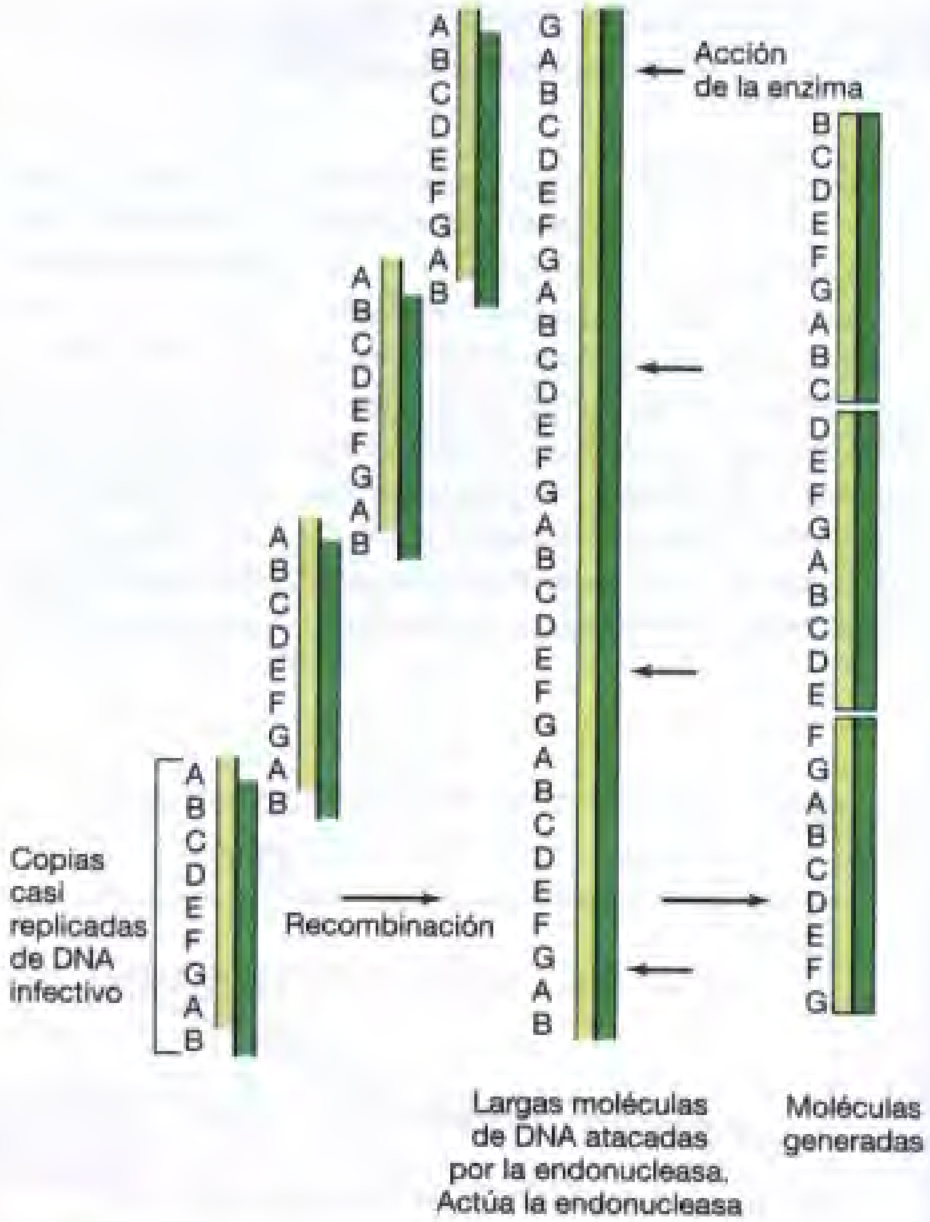

A B C D E F G A B
G A B C D E F G A B C D E F G A B C D E F G A B C D E F G A B
Acción de la enzima
B C D E F G A B C
D E F G A B C D E
F G A B C D E F G
Copias casi replicadas de DNA infectivo
Recombinación
Largas moléculas de DNA atacadas por la endonucleasa. Actúa la endonucleasa
Moléculas generadas

Figura 9.13 Generación de moléculas de DNA del virus T4 con la longitud apropiada y secuencias permutadas por la actividad de una enzima que corta fragmentos de una longitud determinada con independencia de la secuencia. Izquierda: copias casi replicadas del genoma infectivo del T4, flecha, recombinación (véase Sección 10.5); centro: flechas, sitios de ataque enzimático; derecha: moléculas generadas.

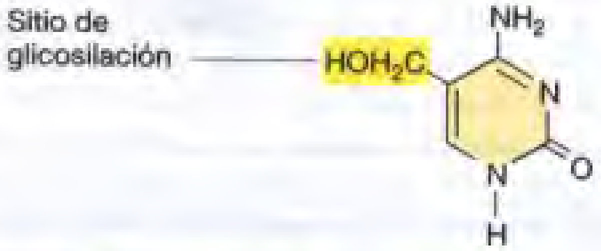


Figura 9.14 La base peculiar del DNA de los bacteriófagos de la serie T-par, 5-hidroximetilcitosina. Se indica el sitio de glicosilación.

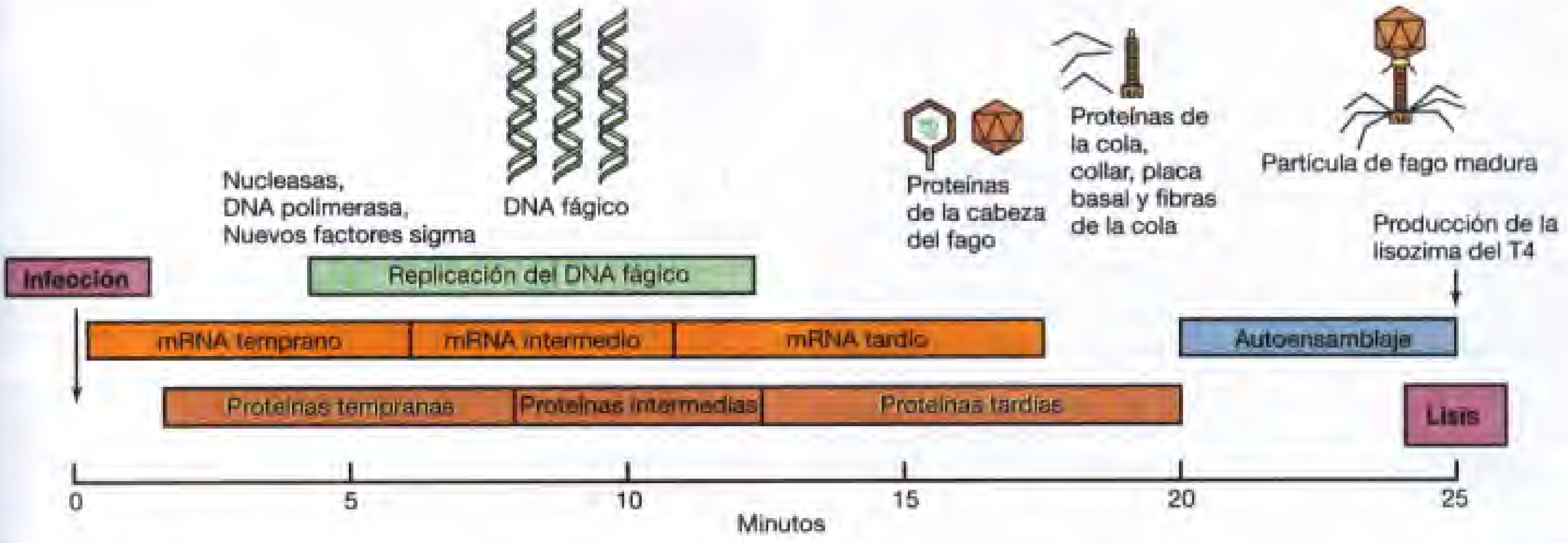


Figura 9.15 Evolución temporal de la infección por el fago T4. Tras la inyección del DNA se produce mRNA temprano e intermedio que codifica nucleasas, DNA polimerasa, nuevos factores sigma específicos del fago y otras proteínas implicadas en la replicación del DNA. El mRNA tardío codifica proteínas estructurales del virión y la lisozima del T4, necesaria para lisar la célula y permitir la liberación de nuevas partículas del fago.

tores del fago. Los promotores tempranos son leídos directamente por la RNA polimerasa del hospedador y requieren la función del factor sigma celular. (Los primeros genes del T4 que se transcriben a veces se denominan *genes tempranos inmediatos* para distinguirlos de los *genes tempranos retardados*, cuya transcripción requiere la síntesis de algunas proteínas del fago, posiblemente implicadas en el bloqueo de la terminación de la transcripción normal.) Las proteínas específicas del fago sintetizadas a partir de genes tempranos modifican covalentemente las subunidades alpha de la RNA polimerasa del hospedador (*véase* Sección 7.8), y otras se unen también a la polimerasa. Estas modificaciones cambian la especificidad de la polimerasa que ahora reconoce promotores intermedios del T4. Una de las proteínas tempranas del T4, llamada MotA, aparentemente reconoce una secuencia particular en estos promotores. La transcripción de los promotores tardíos requiere un nuevo factor sigma codificado por el T4 y, curiosamente, también síntesis del DNA del T4. Muchos bacteriófagos usan la modificación secuencial de la RNA polimerasa para regular la expresión génica.

El T4 codifica más de 20 nuevas proteínas que se sintetizan inmediatamente después de la infección. Éstas incluyen enzimas para la síntesis de la base inusual 5-hidroxymetilcitosina, y para su glucosilación, así como una enzima que destruye el precursor normal del DNA deoxicitidín trifosfato. Además, el T4 codifica un número de enzimas que tienen funciones similares a las enzimas implicadas en la síntesis de DNA propias del hospedador pero se forman en mayores cantidades, permitiendo de este modo la síntesis de DNA específico del T4.

Como ya se ha mencionado, el T4 codifica más de 250 proteínas, y casi la cuarta parte participan en la síntesis o el procesamiento del DNA que se produce en la replicación. (Varias de ellas son también nucleasas que destruyen el DNA del hospedador para obtener los bloques para construir el DNA vírico.) Recuérdese que a efectos de empaquetamiento, el DNA de cada virión se corta a partir de una molécula mucho más larga de manera que el DNA empaquetado sea lineal, con redundancias terminales y ligeramente mayor que la mínima longitud del genoma. Esta configuración no es una mera complicación, sino el resultado del mecanismo que usa el T4 para replicar completamente su genoma lineal.

Recuérdese que, cuando comentamos la replicación del DNA en el Capítulo 7, mencionamos que existía una dificultad inherente a la replicación completa del DNA lineal, y que los elementos genéticos lineales utilizaban diferentes soluciones para superar este problema (*véase* Sección 7.7). El DNA terminalmente redundante del T4 que infecta a una célula hospedadora se replica primero como una unidad, y luego estas unidades se recombinan (la recombinación se describe en el Capítulo 10) para formar un gran concatémero (*véase* Figura 9.13). A partir de este concatémero se cortan las nuevas moléculas de DNA para ser empaquetadas en los nuevos viriones. Puesto que la recombinación tiene lugar en las secuencias repetidas de los extremos, no se pierde información. Veremos otros mecanismos que usan los virus con genomas lineales de DNA para superar esta dificultad (*véase* Secciones 9.10, 16.4 y 16.5).

Muchos de los genes tardíos codifican proteínas estructurales del virión, incluyendo las de la cabeza y la cola. El ensamblaje de las cabezas y las colas se produce independientemente, el DNA es empaquetado en la cabeza ensamblada, y la cola y las fibras de la cola se añaden luego. La salida del virus de la célula ocurre luego como resultado de la lisis celular. El fago codifica una enzima lítica, la *lisozima del T4*, que ataca al peptidoglicano de la célula hospedadora.

Tras el ciclo lítico, que dura sólo unos 25 minutos (Figura 9.15), se liberan más de 100 nuevas partículas víricas de la célula hospedadora, que ha sido casi completamente destruida. El T4 es un buen ejemplo, pero no un ejemplo extremo, de un virus virulento. A continuación, examinaremos un virus que tiene otras opciones en su ciclo de vida.

✓ 9.9 *Revisión de conceptos*

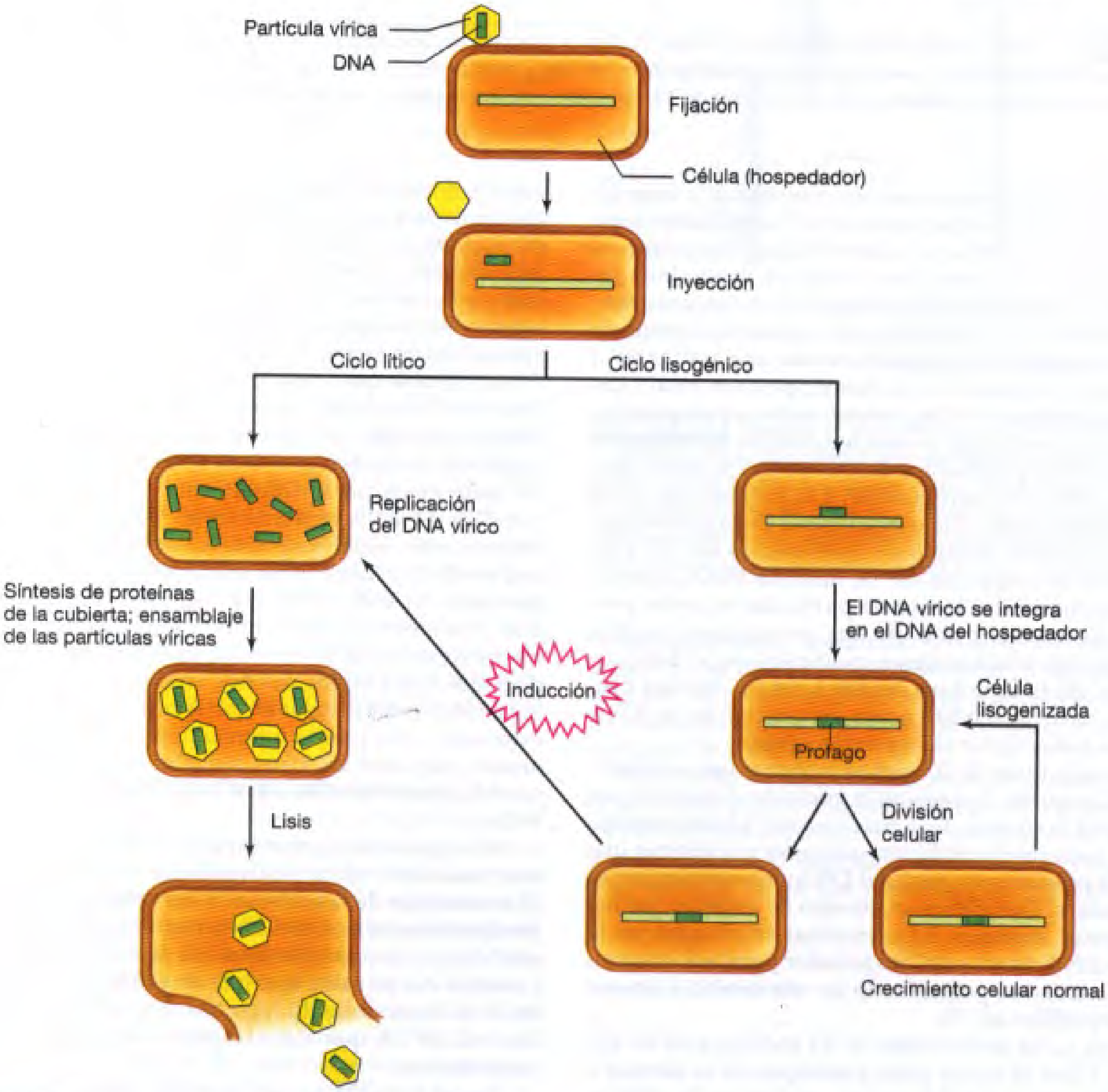
Una vez que un virus virulento se fija a una célula hospedadora e inyecta su DNA en ella, la expresión de los genes del virus es regulada para reconducir la maquinaria sintética del hospedador a la reproducción del ácido nucleico y proteínas virales. Los nuevos viriones se ensamblan luego y se liberan de la célula, generalmente mediante lisis celular. El T4 es un ejemplo de un bacteriófago virulento con genoma de DNA bicatenario.

- ✓ ¿Qué es un virus virulento?
- ✓ Cite un ejemplo de un mecanismo utilizado por el T4 para asegurar que se transcriben sus genes en lugar de los genes del hospedador.

9.10 Bacteriófagos atemperados: lambda

Muchos virus son **virulentos**, pero otros virus, aunque capaces de destruir células, tienen la opción de un ciclo de vida diferente con efectos más sutiles sobre el hospedador. Tales virus se denominan **atemperados**. Estos virus pueden entrar en un estado llamado **lisogenia**, en el que la mayor parte de los genes víricos no se expresa y el genoma viral se replica en sincronía con el cromosoma celular.

El genoma de un fago atemperado se duplica con el del hospedador y durante la división celular pasa de una generación bacteriana a la siguiente. Bajo ciertas condiciones, estas bacterias, llamadas **lisogénicas**, pueden producir es-



Partícula vírica
DNA
Fijación
Célula (hospedador)
Inyección
Ciclo lítico
Ciclo lisogénico
Replicación del DNA vírico
Síntesis de proteínas de la cubierta; ensamblaje de las partículas víricas
Lisis
Inducción
El DNA vírico se integra en el DNA del hospedador
Profago
Célula lisogenizada
División celular
Crecimiento celular normal

Figura 9.16 Consecuencias de la infección por un bacteriófago atemperado. Las alternativas tras la infección son la replicación y la liberación de virus maduros (lisis) o la integración del DNA del virus en el DNA del huésped (lisogenización). La célula lisogénica puede ser también inducida a producir virus maduros y lisis.

pontáneamente viriones del fago atemperado. La lisogenia tiene probablemente importancia ecológica pues muchas bacterias aisladas de la naturaleza son lisogénicas para uno o más bacteriófagos. La lisogenia no está limitada a los bacteriófagos. Muchos virus animales mantienen relaciones similares con sus hospedadores.

Visión general del ciclo de vida de un fago atemperado

No es la presencia, ni siquiera la replicación del DNA vírico lo que origina la producción de nuevos viriones y la muerte de la célula hospedadora. Lo que es perjudicial es, en realidad, la *expresión* del genoma del virus. Es posible imaginar células hospedadoras que albergan genomas víricos sin sufrir daño alguno, si la expresión del genoma vírico pudiera estar controlada. Ésta es la situación que tiene lugar en la lisogenia. Sin embargo, cuando este control se pierde, el virus entra en el ciclo lítico, produce nuevos viriones, y finalmente, la célula hospedadora se lisa. En un momento determinado, en un cultivo de células lisogénicas, sólo una pequeña fracción de células, 0,1-0,0001%, produce virus y se lisa, mientras que la mayoría ni produce virus, ni se lisa. Aunque, de hecho, las células de una cepa lisogénica raramente producen virus, cada célula tiene la capacidad potencial de hacerlo. La lisogenia puede, por tanto, considerarse como un rasgo genético a nivel de cepa bacteriana.

En la Figura 9.16, se muestra una visión global del ciclo de vida de un bacteriófago atemperado. El fago atemperado no existe dentro de la célula en su estado maduro infeccioso, sino en una forma latente denominada estado de **provirus** o **profago**. En el ejemplo de la Figura 9.16, el profago está integrado en el cromosoma bacteriano y se replica junto con la célula hospedadora siempre que los genes que controlan el ciclo lítico no se expresen. Este control se efectúa normalmente mediante una proteína represora codificada por el virus (lo que indica que al menos esta proteína se expresa). La proteína represora viral no sólo controla los genes líticos del profago, sino que además evita la expresión de cualquier genoma del mismo virus que penetre en la célula. Esto ocasiona que las células lisogénicas tengan **inmunidad** frente a la infección por el mismo tipo de virus.

Sin embargo, si este represor es inactivado o se inhibe su síntesis, el profago resulta inducido (Figura 9.16 centro). Esta inducción resulta en la producción de nuevos viriones y en la lisis de la célula hospedadora. En algunos casos (como veremos más adelante), la inducción puede ser provocada por las condiciones ambientales. Si un virus pierde la capacidad para abandonar el genoma de la célula (a causa de una mutación) se convierte en un virus críptico. Los estudios de secuenciación de genomas han mostrado que muchos cromosomas bacterianos contienen trozos de DNA que fueron parte de un genoma vírico.

Nótese que la Figura 9.16 muestra que la infección de una célula por un virus atemperado puede conducir al ciclo lítico o al ciclo lisogénico. A continuación, comentaremos los factores que favorecen una u otra vía durante la infección por el bacteriófago lambda.

El bacteriófago lambda

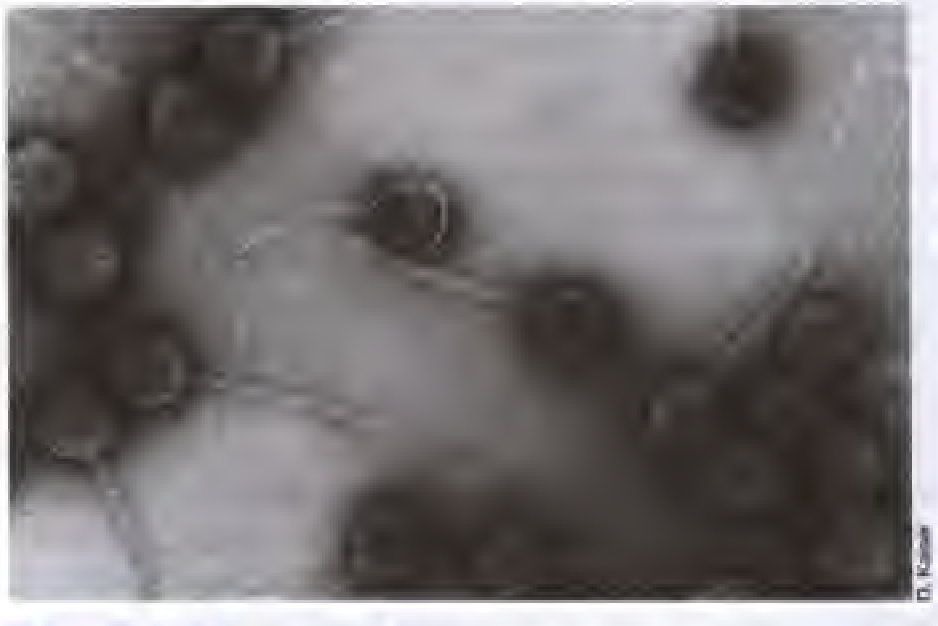
Uno de los fagos atemperados mejor estudiados es el fago lambda que infecta a *Escherichia coli*; el conocimiento que tenemos de los mecanismos implicados en la lisogenización o en el ciclo lítico de este fago son muy avanzados. Morfológicamente, las partículas de lambda son semejantes a las de otros muchos bacteriófagos (Figura 9.17; *véase* también Figura 9.12).

El genoma de lambda consiste en una molécula de DNA lineal bicatenario, pero en el extremo 5′ de cada una de las bandas hay una cola de cadena sencilla de 12 nucleótidos de longitud. Estas terminaciones monocatenarias son complementarias (se dice que los extremos del DNA son *cohesivos*). Así, cuando los dos extremos del DNA están libres en la célula hospedadora, se asocian y el genoma adopta la forma de un circulo bicatenario. Por tanto, en el caso de lambda el problema de replicar el DNA lineal se resuelve de manera muy diferente al del T4. En su forma circular el DNA contiene 48.502 pares de bases. La Figura 9.18 es una representación del mapa genético de lambda tras su circularización.

Antes de considerar la organización y expresión de estos genes, debemos considerar que lambda, como otros bacteriófagos temperados, puede llevar a cabo un **ciclo lítico** o uno **lisogénico**. Normalmente, lambda escoge la vía lítica (es decir, la mayoría de las veces se comporta como un fago virulento). Sin embargo, la regulación de la expresión génica en lambda es tal que, a veces, no resulta elegido el ciclo lítico. Analizaremos ahora la infección de una célula por lambda para ver cómo se presentan estas opciones.

Infección y ciclo lítico de lambda

El virión de lambda se fija a una proteína específica de la pared celular de *Escherichia coli* (*véase* Sección 9.6) e inyecta su DNA. El DNA se circulariza casi inmediatamente, y, si la célula no es ya lisogénica para lambda (y, por tanto, no inmune), comienza la expresión del genoma del fago. Las primeras etapas en la expresión génica son las mismas, con independencia de que el resultado final sea lisis o lisogenia.



D. Kaiser

Figura 9.17 Micrografía electrónica de partículas del bacteriófago lambda (tinción negativa). La cabeza de cada partícula tiene unos 65 nm de diámetro.

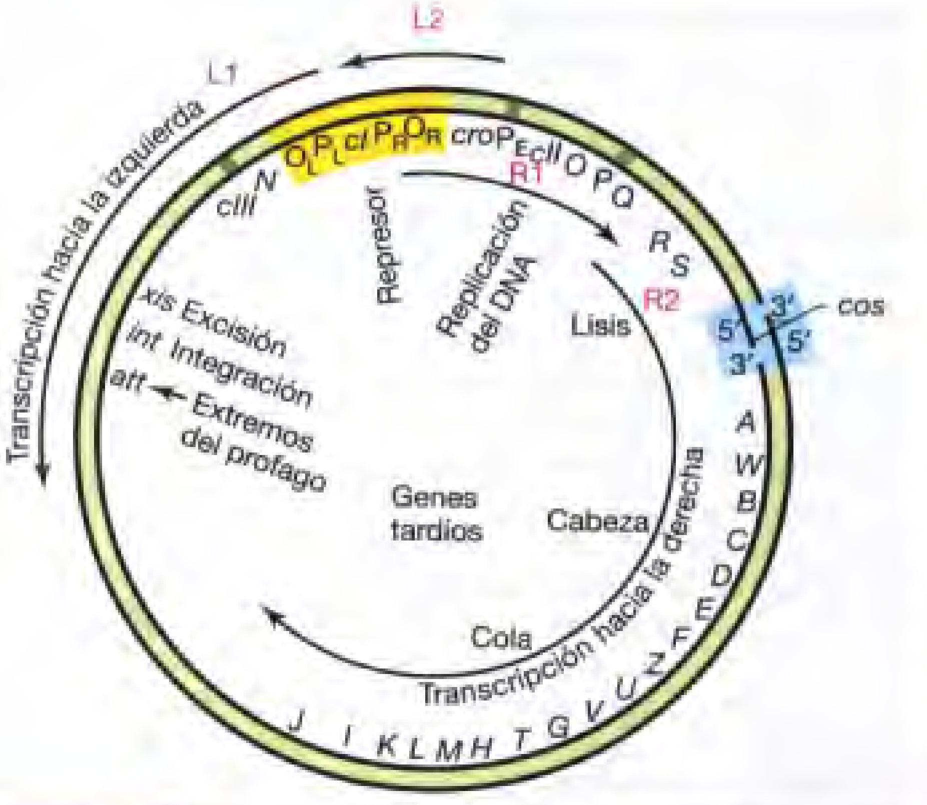

L2
L1
Transcripción hacia la izquierda
$O_L P_L$ cI $P_R O_R$ cro P_E cII O P Q
N
cIII
R1
Represor
Replicación del DNA
R S
R2
Lisis
3′
5′
5′
3′
cos
xis Excisión
int Integración
att ← Extremos del profago
Genes tardíos
Cabeza
A W B C D E F Z U V G T H M L K I J
Transcripción hacia la derecha
Cola

Figura 9.18 Mapa genético y molecular del fago lambda. Los genes se designan por letras; *att*, sitio de fijación al cromosoma del hospedador. Genes de especial interés: *cI*, proteína represora; O_R, operador derecho; P_R promotor derecho; O_L, operador izquierdo; P_L, promotor izquierdo; *cro*, gen para el segundo represor; N, regulador positivo que contrarresta la terminación dependiente de rho; J-U, genes que codifican proteínas de la cola; Z-A, genes que codifican proteínas de la cabeza. La región regulatoria de lambda (mostrada en amarillo) está situada en la parte superior de este mapa circular. También se conoce como región de la inmunidad y contiene el gen *cI*. El sitio creado cuando se unen los extremos cohesivos del genoma de lambda se denomina *cos* (mostrado en azul). La transcripción temprana de lambda ocurre fundamentalmente hacia la izquierda (sentido anti-horario) a partir de P_L y hacia la derecha (sentido horario) a partir de P_R. El principal transcrito hacia la izquierda se inicia como L1, y el principal transcrito temprano hacia la derecha se indica como R1. Los tres terminadores específicos afectados por la proteína N se indican con marcas grises sobre el DNA. El transcrito tardío hacia la derecha, que codifica las proteínas de la cabeza y de la cola y las proteínas de función lítica, se indica como R2 y comienza en un promotor cercano al gen Q. El transcrito marcado como L2 es el transcrito regulado positivamente a partir de P_E y codifica la proteína represora.

La producción de RNA, usando la RNA polimerasa del hospedador comienza en algunos promotores, dos de los cuales, llamados P_L (promotor izquierdo) y P_R (promotoor derecho), están situados a cada lado de la región regulatoria mostrada en la Figura 9.18. Éstos producen transcritos cortos que son traducidos para dar los productos de los genes *N* y *cro*. Ambas proteínas están implicadas en procesos regulatorios. La proteína Cro (el producto del gen *cro*) participa en la selección entre el ciclo lítico y el lisogénico, y, más adelante, veremos cuál es su función. La proteína N es una proteína *antiterminadora* que permite a la RNA polimerasa transcribir más allá de ciertos terminadores específicos (marcados en la Figura 9.18), haciendo más largos los transcritos de P_L y P_R. Estos largos mRNAs se traducen en más proteínas, que incluyen los productos de los genes *cII* y *cIII*. El antiterminador no es completamente efectivo en el terminador que precede al gen *Q*, de manera que sólo se hace una pequeña cantidad de la proteína Q.

La síntesis inicial del DNA es bidireccional y origina los típicos intermediarios en theta (*véase* Sección 7.5). En esta fase, todavía es posible que lambda pueda derivar hacia el ciclo lisogénico. Sin embargo, consideremos la situación resultante si ese cambio *no* tuviera lugar.

La proteína Q es también una proteína antiterminadora. Si su concentración se hace lo suficientemente alta, permitirá la transcripción de un promotor próximo para sintetizar el transcrito indicado como R2 en la Figura 9.18. Este transcrito es traducido para originar las proteínas tardías, todas las proteínas estructurales necesarias para construir un virión, y las proteínas necesarias para la lisis celular. Al mismo tiempo que la proteína Q ha alcanzado estos niveles, la proteína Cro (*véase* texto anterior) ha alcanzado también niveles que le permiten bloquear la transcripción a partir de P_L y P_R mediante la unión a O_L (operador izquierdo) y O_R (operador derecho). Por consiguiente, Cro opera como una proteína represora (*véase* Sección 8.5).

El mecanismo de acción de la proteína Cro en O_R se detalla en el diagrama de la Figura 9.19. Nótese que en este operador hay tres sitios similares, pero no idénticos, a los que puede unirse la proteína Cro. Primero se une al sitio 3, luego al sitio 2, y sólo cuando estos dos sitios están ocupados, se une al sitio 1. Sólo cuando se une al sitio 1, se bloquea P_R. Una vez que P_L y P_R están bloqueados, no se sintetizan más proteínas cII y cIII. Estas proteínas se necesitan para entrar en el ciclo lisogénico (*véase* más adelante), y, por tanto, cuando Cro se sintetiza en grandes cantidades, lambda queda irrevocablemente dirigido al ciclo lítico.

El bloqueo de estos promotores también ocasiona un cambio en la replicación del DNA de lambda. En la fase donde se sintetizan las proteínas tardías, se forman también largos concatémeros de DNA lineal por **replicación mediante círculo rodante.** En este mecanismo, la replicación se produce sólo en una dirección y puede originar ca-

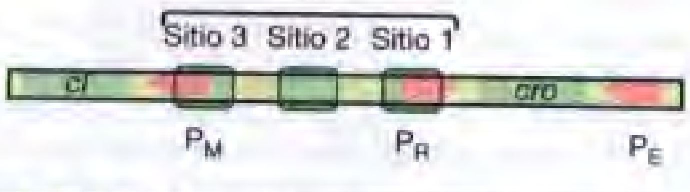


Figura 9.19 Tanto la proteína reguladora Cro como el represor de lambda se unen al operador derecho (O_R) del genoma de lambda para llevar a cabo sus funciones regulatorias. La proteína Cro (producto del gen *cro*) se une a los tres sitios en el orden, sitio 3, luego sitio 2, y luego sitio 1. El represor de lambda se une a estos sitios en el orden opuesto. El promotor P_R se transcribe inmediatamente después de la entrada del fago en la célula. Se necesita transcripción hacia la derecha a partir de este promotor para producir la proteína Cro y otros productos génicos (véase Figura 9.18 para un mapa completo del genoma de lambda). La transcripción hacia la izquierda, a partir de P_E o P_M, resulta necesaria para sintetizar el represor de lambda (producto del gen *cI*). Ambos promotores requieren activación para funcionar.

denas muy largas de DNA replicado (Figura 9.20). El mecanismo es eficiente, al permitir una replicación amplia, rápida y relativamente incontrolada; por tanto, tiene valor en las etapas tardías de la replicación del fago, cuando se necesitan grandes cantidades de DNA para formar los viriones maduros. Los largos concatémeros que se forman son luego cortados en fragmentos adecuados por una DNasa. En el caso de lambda (a diferencia del T4, *véase* Sección 9.9), la DNasa provoca cortes escalonados en sitios *específicos* de las dos cadenas, separados por 12 nucleótidos, lo que proporciona los extremos cohesivos responsables del proceso de circularización. Estas moléculas de DNA se empaquetan en las cabezas del fago, y luego se adicionan las colas y otras proteínas. La célula acaba por lisarse mediante la acción de proteínas codificadas por el fago.

Aunque hay muchas diferencias entre los ciclos líticos de lambda y T4, el resultado final es la producción de nuevos viriones y la lisis de la célula. Sin embargo, en el caso de la infección por lambda, el metabolismo de la célula hospedadora no queda alterado irreversiblemente al comienzo del proceso, lo que permite que pueda establecerse la lisogenización si los sucesos la favorecen.

¿Lisis o lisogenia?

Hemos visto que los genes del fago están controlados de tal manera que las proteínas y ácidos nucleicos virales se fabrican en las cantidades apropiadas y en el momento adecuado. En muchos virus, los modos de expresión están siempre programados de la misma manera. Sin embargo, lambda y otros virus temperados tienen un *interruptor genético* que controla si se sigue el ciclo lítico o el lisogénico. Hasta ahora, hemos analizado las etapas del ciclo lítico de lambda. A continuación, consideraremos el funcionamiento del interruptor genético que permite la lisogenia.

Para que se establezca la lisogenia, deben producirse dos sucesos: debe impedirse la producción de las proteínas tardías, y debe integrarse una copia de lambda en el cromosoma del hospedador. Para prevenir la síntesis de proteínas tardías, debe sintetizarse el producto del gen *cI*. Esta proteína es el **represor de lambda**. Si se sintetiza, *reprimirá la síntesis de todas las otras proteínas codificadas por lambda*. Se necesita para establecer la lisogenia y para mantener el estado lisogénico. El gen *cI* se localiza entre P_L y P_R (*véase* Figura 9.18), pero estos promotores están orientados de manera que ninguno transcribe el gen *cI*. El promotor que puede producir el mRNA del gen *cI* durante la infección se llama P_E (promotor del establecimiento de la lisogenia) y está localizado en el mapa ligeramente a la derecha del gen *cro*, pero orientado en dirección opuesta a P_R. La transcripción ocurre, por tanto, en la dirección opuesta a la promovida por P_R (Figuras 9.18 y 9.19). A diferencia de otros promotores mencionados previamente, P_E debe ser *activado*. Una vez activado, se sintetiza el represor de lambda y se establece el ciclo lisogénico.

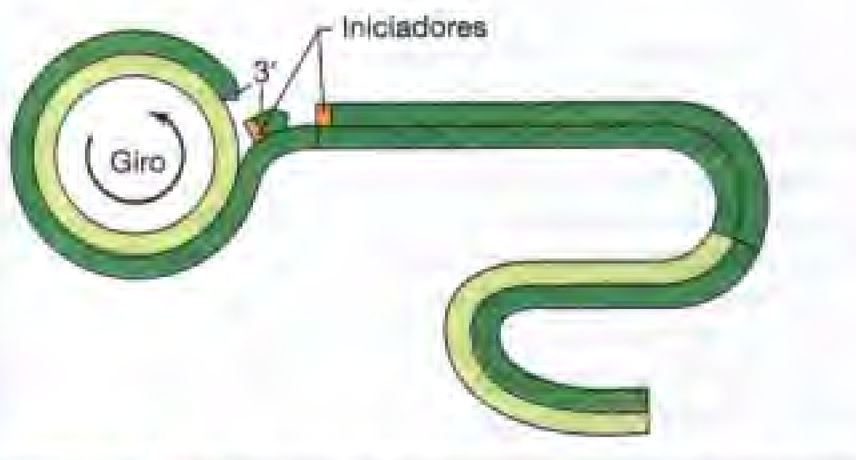


Figure 9.20 Una fase final de la replicación de lambda por el círculo rodante. Ambas cadenas de DNA se están copiando en la horquilla de replicación, y ya se han sintetizado dos copias del genoma. Nótese que esta síntesis es *asimétrica*, ya que una banda parental sirve continuamente de templado y la otra se usa sólo una vez.

El producto del gen *cII* es una *proteína activadora* (*véase* Sección 8.6) que activa el promotor P_E (y otro promotor requerido para la síntesis de la integrasa) (*véase* más tarde). Aunque la proteína cII es una proteína temprana, generalmente es inestable en *Escherichia coli*, ya que es degradada por una proteasa celular (una enzima que degrada proteínas). Si la proteína cII se degrada, entonces no hay posibilidad de que se siga el ciclo lisogénico. Sin embargo, esta proteína puede ser estabilizada por la proteína cIII del fago si no hay un exceso de la proteasa del hospedador (o si hay un exceso de la proteína cIII). Si la proteína cII resulta estabilizada, activará P_E y se producirá la proteína represora de lambda. Este proceso más bien complicado responde a las condiciones del hospedador.

El represor de lambda se une a O_L y O_R, como lo hace la proteína Cro, pero, dentro de estos operadores, se une a los sitios de unión en orden opuesto a como lo hace Cro (*véase* Figura 9.19). Esto es, primero al sitio 1, anulando P_R (y P_L por un mecanismo similar). Cuando esto ocurre, cesa la síntesis de proteínas tardías, y lambda no puede entrar en el ciclo lítico.

Sin embargo, sin la proteína cII no puede funcionar P_E. Por tanto, si se va a mantener el estado lisogénico debe haber otro modo de transcribir el gen *cI*. En la Figura 9.19 se muestra otro promotor, P_M (promotor del mantenimiento), que está orientado hacia el gen *cI* (en la misma dirección que P_E). Este promotor se *activa* cuando el represor de lambda se une al sitio 1 y se reprime sólo cuando el represor de lambda está unido a los tres sitios. Por consiguiente, el represor de lambda es tanto un *represor* como un *activador* cuando se une al sitio 1, reprimiendo P_E y activando P_M. Este tipo de regulación se sigue produciendo incluso después de la lisogenización. El represor de lambda sólo se produce tras la integración de lambda como profago.

Integración

La integración del DNA de lambda en el cromosoma de *Escherichia coli* ocurre en un sitio particular y es requerido para la lisogenia. La integración se produce por inserción del DNA del virus en el cromosoma del hospedador (lo que en realidad alarga tal genoma en una longitud equivalente a la del DNA vírico). Como se ilustra en la Figura 9.21, tras la inyección, los extremos cohesivos de la molécula lineal de lambda se juntan para formar un círculo, y este DNA circular es el que se integra en el genoma del hospedador (la región que se crea cuando estos extremos se juntan se llama *cos*). Para establecer la lisogenia, los genes *cI* e *int* (que codifica la *integrasa*) deben expresarse, como ya hemos comentado. El proceso de integración requiere la integrasa, que es una topoisomerasa específica de sitio que cataliza la recombinación entre el fago y los sitios de fijación en el cromosoma bacteriano (marcados como *att* en las Figuras 9.18 y 9.21). El gen *int* tiene un promotor que, como P_E, se activa por la proteína cII.

Durante el crecimiento celular, el sistema de represión de lambda evita la expresión de los genes del lambda integrado excepto la del gen *cI*, que codifica represor. Durante la replicación del DNA del hospedaddor, el DNA de lambda se replica junto con el resto del genoma celular y se transmite a las células de la progenie. Cuando ocurre la liberación de la represión (*véase* más adelante) se origina el ciclo lítico de lambda. Para su excisión del cromosoma, se requiere una *excisionasa* (codificada por el gen *xis*) y el producto del gen *int*.

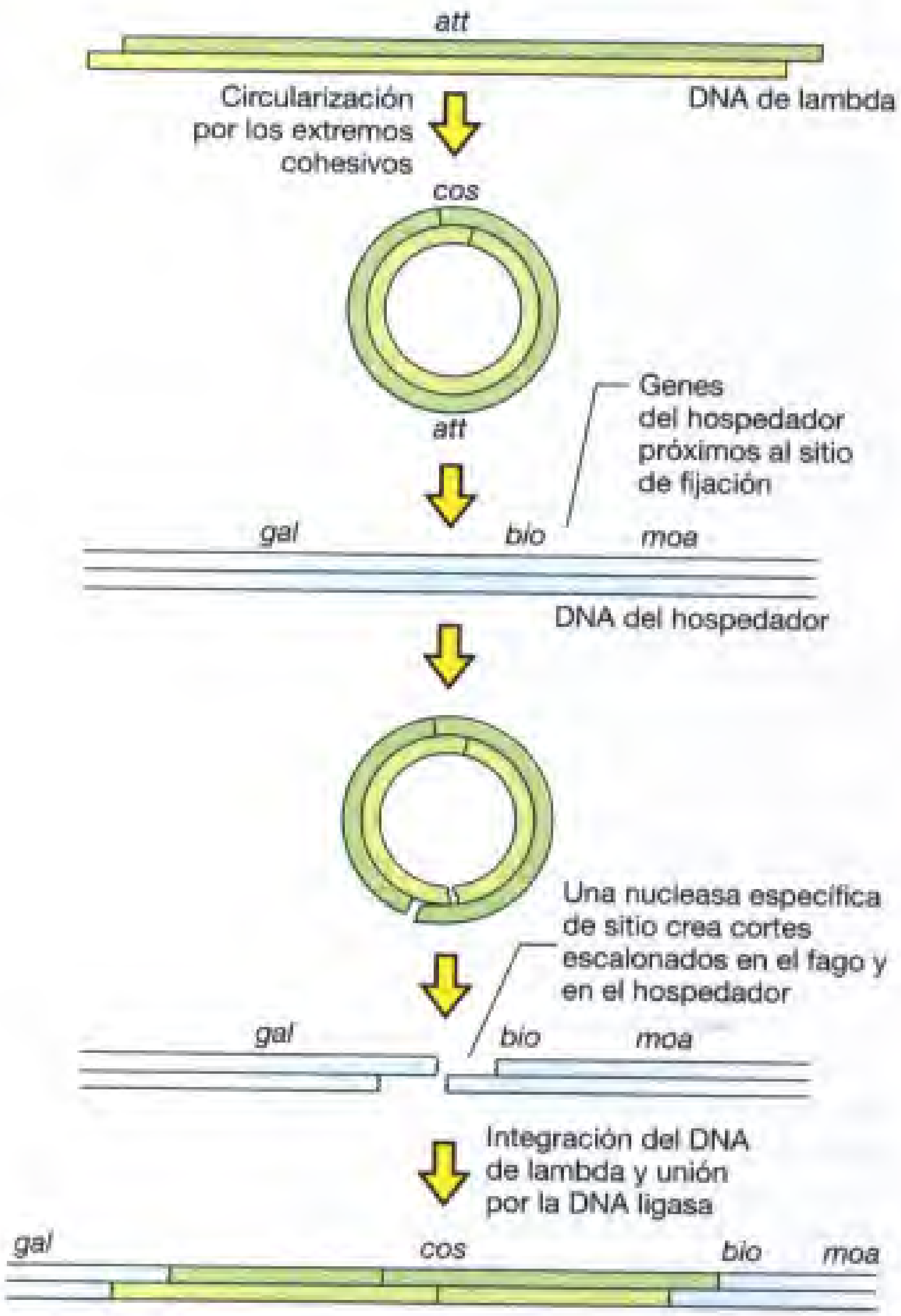

att
Circularización por los extremos cohesivos
DNA de lambda
cos
att
Genes del hospedador próximos al sitio de fijación
gal
bio
moa
DNA del hospedador
Una nucleasa específica de sitio crea cortes escalonados en el fago y en el hospedador
gal
bio
moa
Integración del DNA de lambda y unión por la DNA ligasa
gal
cos
bio
moa

Figura 9.21 Integración de lambda en el hospedador. *Véase* el mapa genético, Figura 9.18, para detalles del orden de los genes. La integración siempre ocurre en un sitio específico del DNA del hospedador, e implica un sitio específico de fijación (*att*) del DNA del fago. Se indican algunos genes del hospedador cercanos al sitio de fijación, operón *gal*, utilización de galactosa; operón *bio*, biosíntesis de biotina; operón *mos*, biosíntesis del cofactor de molibdeno. En la integración del DNA del fago está implicada una enzima específica (integrasa), y el apareamiento de los extremos complementarios.

Ciclo lítico de lambda por inducción

Los agentes que inducen la producción de fagos a partir de lisógenosde lambda (es decir, células que contienen lambda como profago) son agentes que dañan el DNA. Éstos incluyen la luz ultravioleta, los rayos X, y compuestos químicos del tipo de la mostaza nitrogenada. Cuando se produce un daño en el DNA se pone en marcha un mecanismo de defensa del hospedador, llamado respuesta SOS (*véase* Sección 10.3). Se activa entonces un conjunto de genes, algunos de los cuales ayudan a la bacteria a sobrevivir a la radiación. Una de las consecuencias del daño al DNA es que una proteína bacteriana llamada RecA (normalmente implicada en la recombinación genética) se convierte en una clase especial de proteasa que participa en la destrucción del represor de lambda. Con la destrucción del represor de lambda, desaparece la inhibición de la expresión de los genes líticos. La actividad de la proteasa RecA, manifestada tras el daño al DNA, juega normalmente un importante papel en la respuesta celular a los agentes que dañan el DNA (*véase* Sección 10.3). La inducción del bacteriófago lambda es, por tanto, una consecuencia indirecta de la respuesta SOS.

Una vez que se ha inactivado el represor de lambda, desaparece el control ejercido por este represor y se pueden iniciar nuevas transcripciones. Éstos conducen casi inevitablemente a la lisis ya que, incluso si se continúa sintetizando, el represor de lambda resulta inactivado. En raras ocasiones, este tratamiento puede «curar» a una célula. Esto es, el profago se indujo, pero no se replicó y se perdió durante el crecimiento celular posterior.

Otras estrategias usadas por los virus atemperados

El fago lambda constituye uno de los ejemplos mejor estudiados sobre cómo se toma una «decisión» a nivel molecular. Además, es una herramienta genética importante y se usa ampliamente en ingeniería genética como un vector transportador de DNA recombinante. Estos usos de lambda se describen en el Capítulo 10. En bacterias se conocen otros tipos de virus atemperados, y algunos de ellos han sido ampliamente estudiados. El virus P1 (que mencionaremos también en el Capítulo 10) es un virus atemperado que se mantiene en estado lisogénico sin estar integrado como profago, pero se replica como una molécula circular de DNA en el citoplasma, como si fuera un plásmido. Muchos virus animales también pueden existir en un estado de provirus. En la siguiente sección describiremos brevemente los virus animales, antes de comentar los retrovirus con detalle. Los retrovirus insertan una copia de DNA en el genoma hospedador como parte de su ciclo de replicación.

✓ 9.10 Revisión de conceptos

Los virus atemperados, tales como lambda, no siempre causan la muerte de las células que infectan. La célula infectada sobrevive a veces porque el genoma vírico pasa a profago (y se replica con el cromosoma del hospedador), y los genes líticos del profago se mantienen bajo el control de un represor codificado por el virus. Algunas veces este control regulatorio es superado y se produce la inducción del profago, lo que resulta en multiplicación del virus y lisis de la célula. Las células que llevan virus atemperados se denominan lisogénicas.

- ✓ ¿Cuáles son los dos ciclos posibles para un fago atemperado?
- ✓ Describa cómo una única proteína, como el represor de lambda, puede actuar a la vez como activador y como represor.

9.11 Generalidades de los virus de animales

Las primeras cinco secciones de este capítulo se han dedicado a las propiedades generales de todos los virus, y apenas hemos hablado de los virus animales. Aquí comentaremos algunos de los atributos de los virus animales que nos introducirán a la discusión de los retrovirus, un interesante grupo de virus animales que incluye el virus que causa el *síndrome de la inmunodeficiencia adquirida* (SIDA). En el Capítulo 16 analizaremos varios tipos de virus animales con más detalle.

En nuestras discusiones acerca de la reproducción vírica en las Secciones 9.5-9.7, también dimos una visión general del hospedador vírico. Sin embargo, es importante recordar que el hospedador del bacteriófago es una célula procariótica y que el hospedador de un virus animal es una célula eucariótica. Las diferencias entre estos tipos de células originan, en parte, las diferencias en las estrategias de replicación de los virus que las infectan.

Diferencias entre procariotas y eucariotas que afectan a la multiplicación vírica

Ya hemos mencionado el hecho de que la presencia de paredes celulares en *Bacteria* y plantas, y su ausencia en células animales, originan diferencias en los procesos de fijación y penetración del virus (*véase* Sección 9.6). En el caso de muchos bacteriófagos, sólo el genoma y una o dos proteínas alcanzan el citoplasma. En el de los virus animales, sin embargo, el virión entero, o al menos la nucleocápsida, suele penetrar en el citoplasma por endocitosis, y una vez allí debe ser decapsidado. Hay algunos bacteriófagos, tales como el fago envuelto F6 (*véase* Figura 9.12), cuya nucleocápsida entera también entra en la célula.

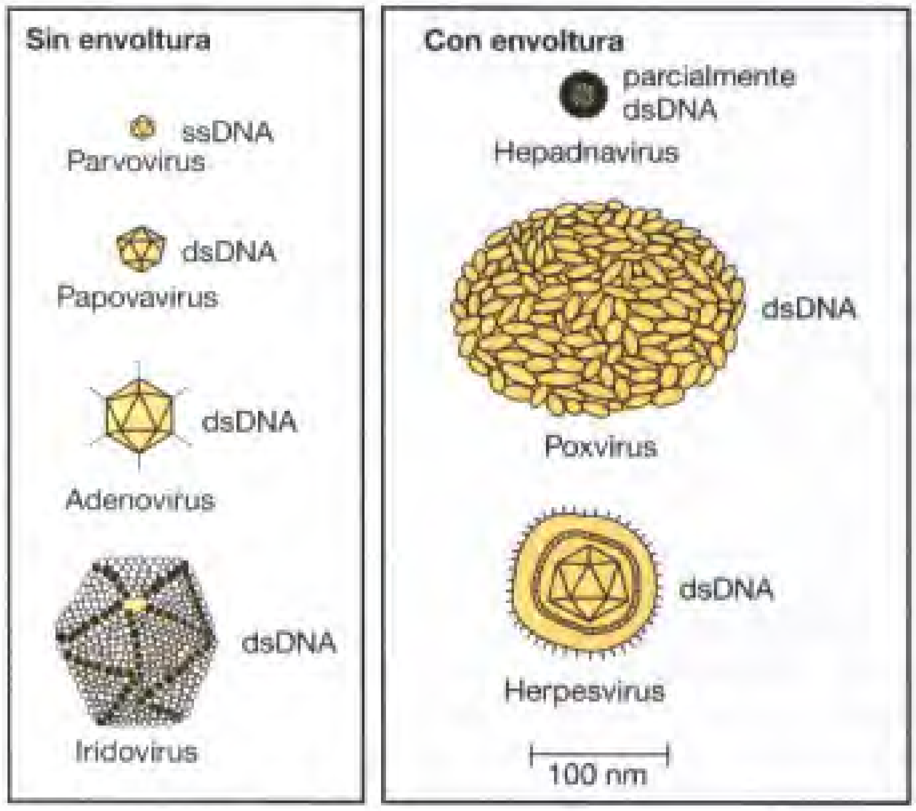
Sin embargo, las diferencias entre la replicación vírica en células procarióticas y ecarióticas se extiende más allá de la mecánica de la penetración vírica. Los procariotas no poseen compartimentalización en sus procesos biosintéticos. El genoma de una bacteria está inmerso en el citoplasma de la célula. La transcripción de su DNA puede ir seguida directamente de traducción, puesto que el proceso de transcripción y traducción no se producen en compartimentos diferentes (*véase* Figura 7.2*a*). Por otra parte, las células animales, al ser eucarióticas, poseen compartimentalización. La replicación del DNA y la transcripción del genoma en mRNA se producen en el núcleo, mientras que la traducción tiene lugar en el citoplasma (*véase* Figura 7.2*b*). Esta compartimentalización afecta al lugar de replicación de los virus animales. Por ejemplo, un DNA de un virus que utiliza las polimerasas del hospedador debe replicarse en el núcleo. Por tanto, podemos esperar diferencias entre las estrategias de replicación de los virus que se multiplican en el núcleo (por ejemplo, Herpesvirus, *véase* Sección 16.11) y los que se multiplican en el citoplasma, (por ejemplo, Poxvirus, *véase* Sección 16.12). Además, los virus que se replican en el núcleo deben ser transportados hasta allí.

Además, los transcritos de los genes eucarióticos deben ser procesados y transportados al citoplasma antes de que puedan utilizarse como mRNA (*véase* Sección 7.12). Este proceso generalmente implica la **eliminación** de *intrones* así como la adición de una **cola de poli-A** (poliadenilación) al extremo 3′ y una guanosina trifosfato metilada, llamada **cap**, al extremo 5′. El cap (casquete) es necesario para la unión del mRNA al ribosoma. Los diferentes modos en que los ribosomas reconocen al mRNA permite que los procariotas usen RNA policistrónico, mientras que los eucariotas usan RNA monocistrónico (*véanse* Secciones 7.11 y 7.15).

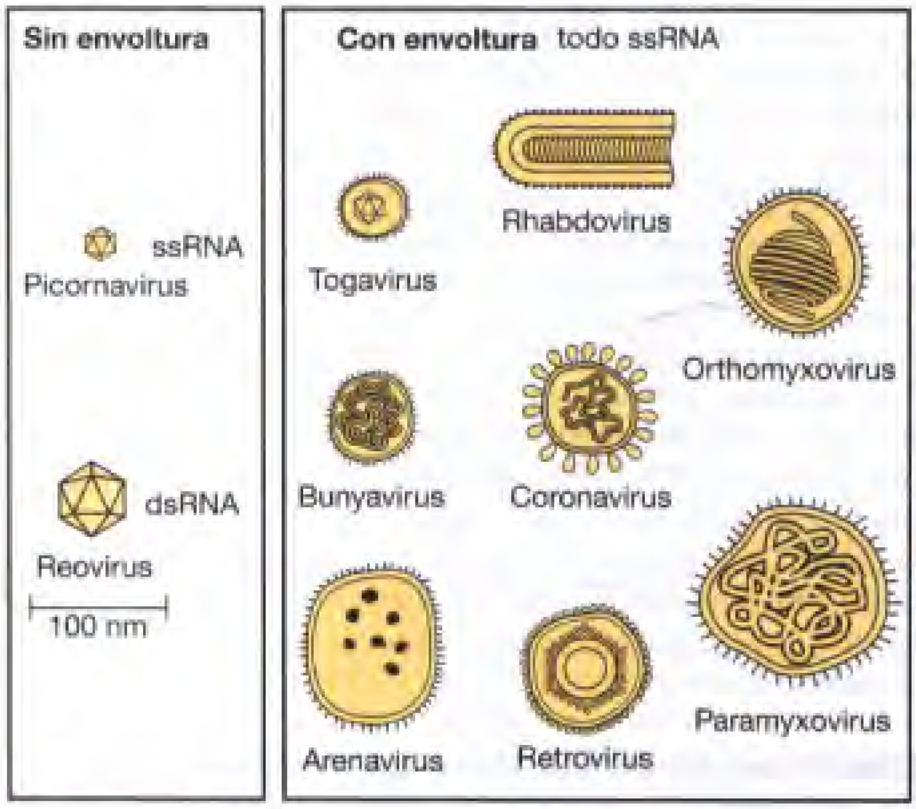
Nótese, sin embargo, que los *genomas* de los virus RNA de eucariotas con banda positiva deben encontrarse en un estado procesado dentro del virión, en el caso de que este RNA vaya a servir directamente como mensajero. En la mayoría de los casos, sin embargo, la cola de poli-A no se añade al genoma de los virus RNA de banda sencilla positiva por ningún tipo de procesamiento, sino que en realidad está codificada por el propio genoma. La adición del cap puede realizarse de diversas maneras. Por supuesto, la adición del cap a muchos RNAs víricos ocurre normalmente en el núcleo durante su síntesis a partir de un DNA molde, al igual que ocurre con el RNA del hospedador (*véase* Sección 7.12). Cuando los mRNAs víricos se sintetizan en el citoplasma, la adición del cap se lleva a cabo por proteínas sintetizadas por el propio virus. Resulta fascinante que el virus de la gripe, cuyo genoma de RNA se replica en el núcleo (*véase* Sección 16.8), tenga un mecanismo para «cortar» los caps del mRNA del hospedador a medida que se sintetizan. Sin embargo, la eliminación de intrones del pre-mRNA eucariótico sólo puede ocurrir en el núcleo utilizando la maquinaria del hospedador (*véase* Sección 7.12). En cambio, toda la maquinaria sintetizadora de proteínas de la célula eucariótica —ribosomas, moléculas de tRNA y componentes accesorios— está en el citoplasma.

Clasificación de los virus de animales

En la Figura 9.22, se ilustran varios tipos de virus de animales. Ya hemos discutido en las Secciones 9.1, 9.2 y 9.7 los principios de la clasificación de los virus. Nótese que hay muchas más clases de virus animales envueltos que virus bacterianos envueltos (*véase* Sección 9.7). Sin duda, esto se debe a las diferencias en la superficie de las células hospedadoras. La mayoría de los virus de animales que han sido estudiados en detalle son los que han podido ser cultivados en cultivos celulares. Los virus de animales se clasifican según los mismos esquemas que los virus bacterianos, como ocurre en el Sistema de Clasificación de Baltimore (*véase* Tabla 9.2), que clasifica los virus sobre la base de los tipos de genomas y las estrategias replicativas. Se conocen virus pertenecientes a todas las categorías y muchos de ellos se estudiarán en el Capítulo 16.



(a) Virus con DNA



(b) Virus con RNA

Figure 9.22 Formas y tamaños relativos de los principales grupos taxonómicos de los virus de vertebrados. El genoma de los hepadnavirus tiene una cadena de DNA y parte de su complementaria.

Consecuencias de la infección en las células animales

Los virus pueden tener efectos variados en las células. La **infección lítica** ocasiona la destrucción de la célula hospedadora (Figura 9.23). Sin embargo, la infección vírica puede ir seguida de otros efectos posibles. En el caso de los virus envueltos, la liberación de los viriones, que ocurre por una especie de gemación, puede ser lenta y la célula hospedadora puede permanecer sin lisarse, esto es, viva, y continuar produciendo virus durante un largo periodo de tiempo. Tales infecciones se denominan **infecciones persistentes** (Figura 9.23). Los virus pueden causar también una **infección latente** en un hospedador. En una infección latente, hay un retraso entre la infección por el virus y la aparición de los síntomas. Las ampollas febriles (herpes labial), causados por el virus herpes simplex (*véase* Sección 16.11), son el resultado de una infección vírica latente; los síntomas reaparecen esporádicamente tan pronto como el virus emerge de la latencia. El estado latente en la infección vírica de una célula animal, no se debe generalmente a la integración del genoma vírico en el genoma de la célula animal, como es el caso de las infecciones latentes por virus temperados.

Virus y cáncer

Varios virus animales participan en las etapas que transforman una célula normal en una célula cancerosa o tumoral (Figura 9.23 y Tabla 9.3). El **cáncer** es un fenómeno celular de crecimiento incontrolado. Muchas células en un animal maduro, aunque estén vivas, no se dividen con frecuencia debido, aparentemente, a la presencia de factores inhibidores del crecimiento que le impiden iniciar la división celular. Estos factores están bajo control genético. Como se indicó en la Sección 9.4, la infección por ciertos tipos de virus animales conduce a un proceso llamado **transformación** durante el cual el crecimiento se descontrola. Las células, que crecen con rapidez, se apilan en acumulaciones que son visibles en los cultivos celulares como **focos infecciosos**. En el cuerpo del animal, las células cancerosas crecen con profusión, originando la formación de grandes masas de células, llamadas *tumores*. El término **neoplasma** se utiliza con frecuencia en la bibliografía médica para describir tumores malignos.

No todos los tumores son dañinos. El cuerpo es capaz de encapsular algunos tumores de manera que evita su extensión; tales tumores no invasivos se llaman **benignos**. Otros tumores, llamados **malignos**, invaden el cuerpo y destruyen los tejidos normales y los órganos. En las fases avanzadas del cáncer, los tumores malignos pueden desarrollar la capacidad de extenderse a otras partes del cuerpo e iniciar nuevos tumores, un proceso denominado **metástasis**.

¿Cómo se convierte una célula normal en cancerosa? El desarrollo del cáncer es claramente un proceso de muchas etapas. Parecen existir muchas causas diferentes del cáncer, incluyendo mutaciones que surgen espontáneamente o como resultado de la exposición a ciertos agentes químicos, llamados *carcinógenos* (*véase* Sección 10.4), o por estímulo físico, tal como la radiación ultravioleta o rayos X. Ciertos virus también producen el cambio

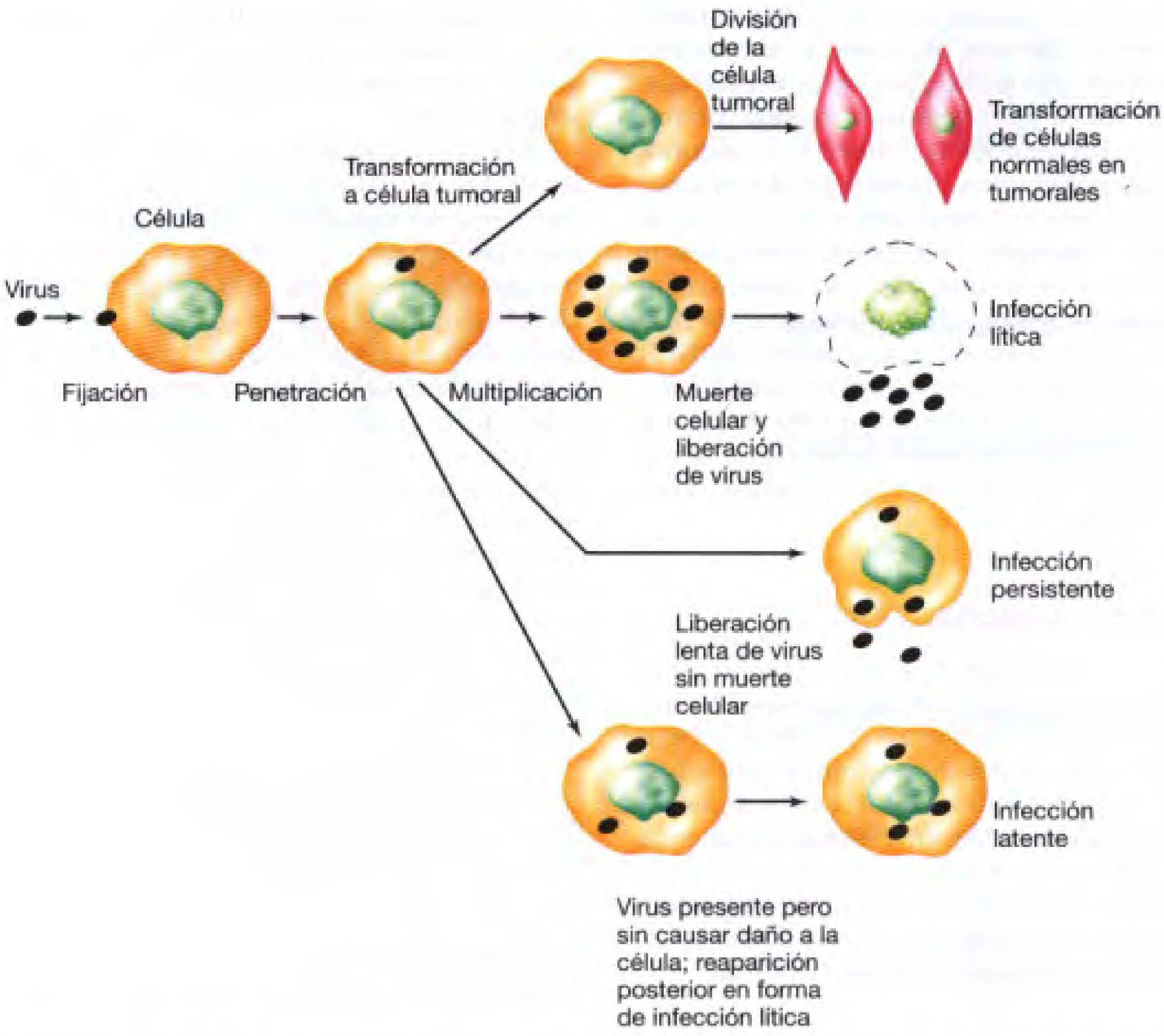

División
de la
célula
tumoral
Transformación
de células
normales en
tumorales
Transformación
a célula tumoral
Célula
Virus
Fijación
Penetración
Multiplicación
Muerte
celular y
liberación
de virus
Infección
lítica
Infección
persistente
Liberación
lenta de virus
sin muerte
celular
Infección
latente
Virus presente pero
sin causar daño a la
célula; reaparición
posterior en forma
de infección lítica

Figura 9.23 Posibles efectos de los virus animales sobre las células hospedadoras. Nótese que, a diferencia de los bacteriófagos, en los virus animales la partícula *entera penetra* en la célula.

genético que origina la iniciación de la formación de tumores.

Los mecanismos que causan el cáncer originan la pérdida del control normal del crecimiento celular. El crecimiento y división de las células normales se regula por al menos dos tipos de genes. El primer tipo, los llamados *proto-oncogenes*, promueven crecimiento, pero están controlados por un segundo tipo, los genes *supresores de tumores*, que restringen el crecimiento. Cambios en cualquiera de ambos tipos pueden conducir al crecimiento incontrolado y, en consecuencia, al cáncer.

La *iniciación* puede consistir en la activación de un proto-oncogén a un **oncogén** (un gen que causa tumor), o en la inactivación de un gen supresor del tumor. Una vez que se inicia el proceso, la célula potencialmente cancerosa puede permanecer durmiente, pero, bajo ciertas condiciones, que generalmente incluyen alguna alteración ambiental, puede convertirse en una célula tumoral, un proceso denominado **promoción.** Una vez que la célula ha sido promovida a la condición cancerosa, la división celular continuada puede conducir a la formación de un tumor.

Aunque la capacidad de un virus para causar tumores en animales se demostró hace muchos años, la relación entre virus y cáncer en el hombre ha sido incierta en la mayoría de los casos. Es difícil probar el origen vírico de un cáncer humano debido a las dificultades para llevar a cabo

TABLA 9.3 Algunos tipos de cánceres humanos en los que participan virus

Cáncer	Virus	Familia	Genoma en el virión
Leucemia de células T en adultos	Virus de la leucemia humana (tipo I)	*Retroviridae*	RNA
Linfoma de Burkitt	Virus de Epstein-Barr	*Herpesviridae*	DNA
Carcinoma nasofaríngeo	Virus de Epstein-Barr	*Herpesviridae*	DNA
Carcinoma hepatocelular (cáncer de hígado)	Virus de la hepatitis B	*Hepadnaviridae*	DNA
Cáncer cervical y cáncer de piel	Virus del papiloma	*Papillomaviridae*	DNA

la investigación necesaria. Sin embargo, está bien establecido que ciertos tipos de tumores humanos se encuentran fuertemente asociados a la infección por virus específicos. Un resumen de algunos de los cánceres humanos con origen vírico definido se presenta en la Tabla 9.3. En algunos casos, el papel jugado por el virus puede ser indirecto; por ejemplo, puede incrementar la frecuencia de un tipo de mutación particular o interferir con procesos normales de la célula que infecta. Esto es lo que, casi con certeza, ocurre en el caso del virus de Epstein-Barr y el linfoma de Burkitt. Además, algunas infecciones víricas pueden conducir a un incremento en el riesgo de cáncer, aparentemente debilitando la capacidad del sistema inmune para detectar y destruir células cancerosas. Esta podría ser la razón por la cual el retrovirus del SIDA incrementa el riesgo del desarrollo de ciertos cánceres.

✓ 9.11 Revisión de conceptos

La multiplicación de los virus animales difiere significativamente de la multiplicación de los virus bacterianos. Muchas de estas diferencias provienen de que los eucariotas poseen compartimentalización en la síntesis de macromoléculas mientras que los procariotas no. No todas las infecciones de las células hospedadoras animales resultan en lisis celular o muerte. En algunos casos, se producen infecciones latentes, en las que el virus permanece infeccioso, aunque durmiente, dentro del hospedador y aparece más tarde de manera espontánea. Algunos virus animales producen la transformación de las células hospedadoras.

- ✓ ¿Qué macromoléculas se sintetizan normalmente en el núcleo y cuáles en el citoplasma de las células eucarióticas?
- ✓ Compare los mecanismos de entrada usados por los virus animales y los virus bacterianos.

9.12 Retrovirus

Como hemos mencionado, los **retrovirus** contienen un genoma de RNA en el virión pero se replican a través de un DNA intermediario (*véase* Sección 9.1). El término *retro* significa «hacia atrás», y el nombre de este tipo de virus deriva del hecho de que parecen transferir la información hacia atrás, desde el RNA al DNA (*véase* Sección 7.1). Estos virus usan la enzima **transcriptasa reversa** para llevar a cabo esta interesante transferencia de información.

Los retrovirus son interesantes por muchas razones. Por ejemplo, fueron los primeros virus en los que se demostró la capacidad de causar *cáncer* y se han estudiado más extensamente por sus características carcinogénicas. También, un retrovirus, el *virus de la inmunodeficiencia humana* (VIH) causa el *síndrome de la inmunodeficiencia adquirida* (*SIDA*) y aunque se le conoce sólo desde los albores de la década de los 80, se ha convertido en un problema mundial de salud pública. Además, el genoma de los retrovirus puede integrarse en el de la célula hospedadora a través del DNA intermediario, y este proceso de integración está siendo estudiado como un medio de introducir genes *extraños* en un hospedador, un proceso denominado *terapia génica*.

Algunas propiedades de los retrovirus se asemejan a las de los virus RNA y otras a las de los virus DNA. Los retrovirus recuerdan en gran medida a elementos genéticos móviles y se consideran a menudo como *elementos transponibles escapados de las células* (*véase* Sección 10.11). Debemos indicar que el uso de la transcriptasa reversa por virus no está restringida a los retrovirus, ya que el virus de la hepatitis B (un virus humano) y el virus del mosaico de la coliflor (un virus vegetal) también usan la transcripción reversa durante su replicación. Pero, a diferencia de los retrovirus, estos últimos encapsidan DNA en lugar de RNA como hacen los retrovirus. Algunos elementos transponibles de eucariotas, llamados *retrotransposones*, también codifican y utilizan la transcriptasa reversa como parte de su ciclo replicativo. Además, se ha descubierto en *Bacteria* una transcriptasa reversa capaz de producir multicopias de pequeños DNA (msDNA) a partir de un RNA molde.

Los retrovirus son virus envueltos (Figura 9.24*a*). Poseen varias proteínas en la cubierta y siete proteínas internas típicas, cuatro de las cuales son estructurales y tres enzimáticas. Las actividades enzimáticas que se encuentran en la partícula del virus son la *transcriptasa reversa*, una *endonucleasa de DNA (integrasa)* y una *proteasa*. El virión también contiene moléculas específicas de tRNA celular que se usan en la replicación (*véase* más adelante).

Características de los genomas retrovíricus y replicación

El genoma de los retrovirus es peculiar. Contiene *dos* moléculas idénticas de RNA monocatenario de complementaridad positiva, de 8,5-9,5 kilobases cada una. El extremo 5' del RNA está bloqueado con el cap, y el extremo 3' poliadenilado, de manera que el RNA es capaz de actuar directamente como mRNA, pero *no* se usa como tal. Un mapa genético de un retrovirus típico se muestra en la Figura 9.24*b*. Aunque hay diferencias entre los mapas genéticos de diferentes tipos de retrovirus, todos contienen las siguientes regiones y en el mismo orden: *gag*, que codifica proteínas estructurales internas; *pol*, que codifica la transcriptasa reversa; y *env*, que codifica proteínas de la cubierta. Algunos, tal como el virus del sarcoma de Rous, lleva un cuarto gen a continuación de *env* que está implicado en la transformación celular y el cáncer (Figura 9.24*c*). Las repeticiones terminales en el mapa juegan un papel importante en el proceso de replicación (*véase* más adelante).

El proceso global de replicación de un retrovirus puede resumirse en las siguientes etapas (Figura 9.25):

1. **Entrada** en la célula mediante fusión con la membrana celular en sitios con receptores específicos.
2. **Decapsidación del virión** en la membrana, pero el genoma y las enzimas permanecen en el núcleo de la partícula.

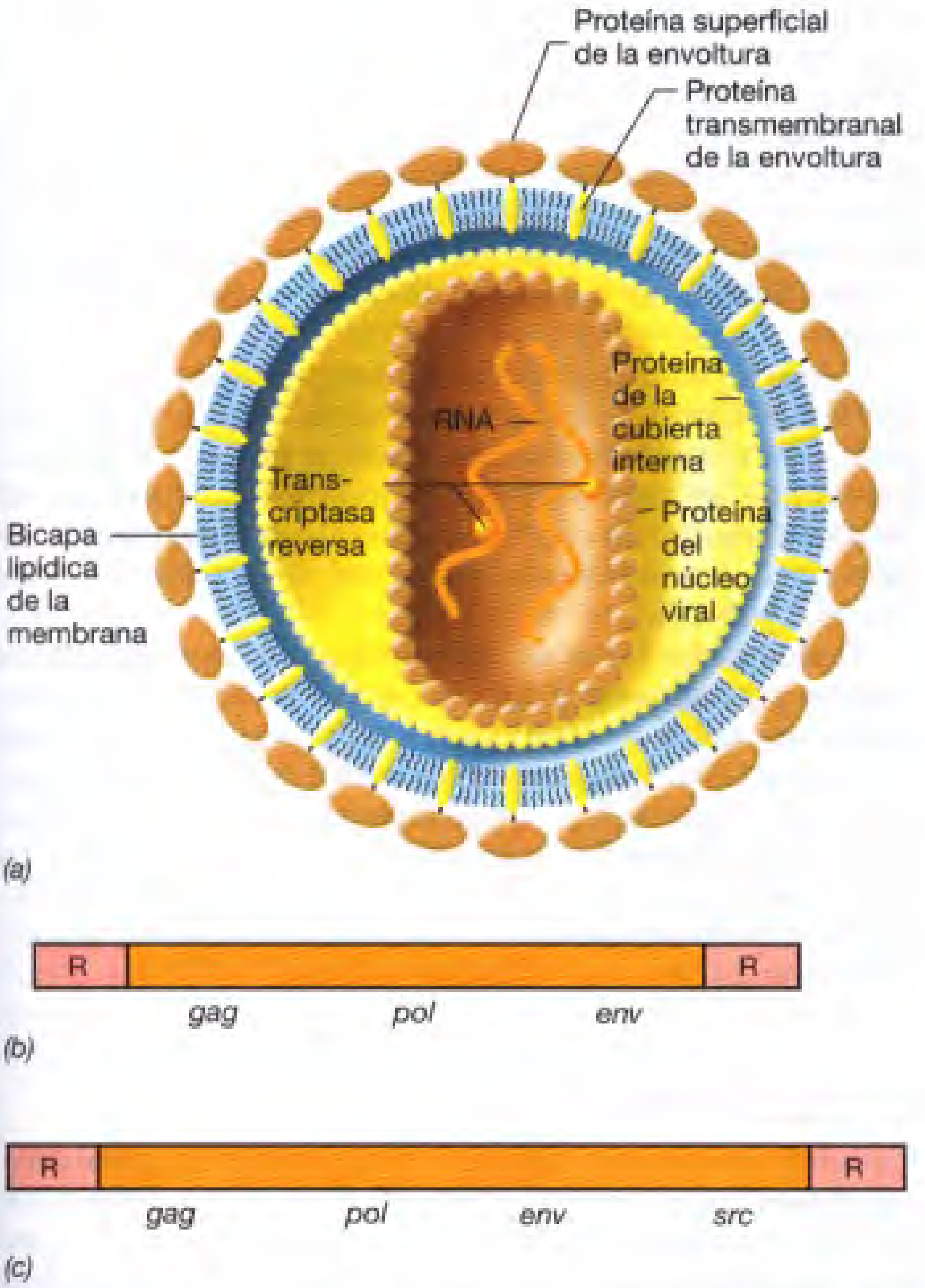

Proteína superficial de la envoltura
Proteína transmembranal de la envoltura
Proteína de la cubierta interna
RNA
Trans-criptasa reversa
Proteína del núcleo viral
Bicapa lipídica de la membrana
(a)
R
R
gag
pol
env
(b)
R
R
gag
pol
env
src
(c)

Figura 9.24 Estructura y función de los retrovirus. (a) Estructura de un retrovirus. (b) Mapa genético del genoma de un retrovirus típico. (c) Mapa genético del virus del sarcoma de Rous, un retrovirus que causa tumores malignos en pájaros. Cada extremo del RNA genómico contiene repeticiones directas (R), y este DNA tiene también un cap en el extremo-5′ y una cola de poli-A en el extremo-3′. Para más detalles, *véase* el texto.

3. **Transcripción reversa** de uno de los genomas RNA en un DNA monocatenario que es posteriormente convertido en un DNA lineal bicatenario por la transcriptasa reversa y entrada de este último en el núcleo.
4. **Integración** de la copia del DNA en el genoma del hospedador.
5. **Transcripción** del DNA vírico, que origina la formación de los mRNA víricos y la progenie de RNA vírico.
6. **Encapsidación** del RNA vírico en nucleocápsidas en el citoplasma.
7. **Gemación** de los viriones envueltos a través de la membrana plasmática y liberación de la célula.

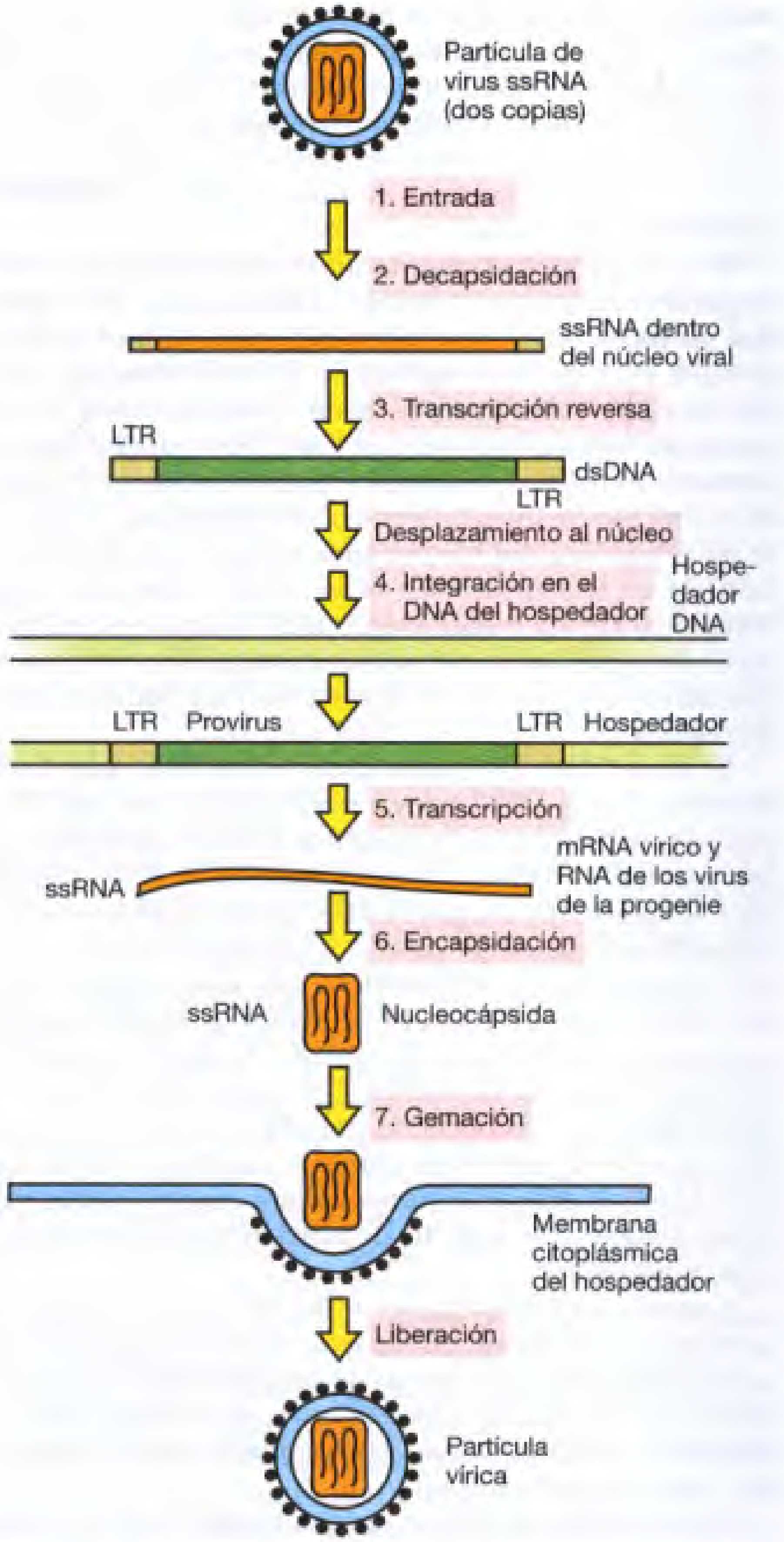

Partícula de virus ssRNA (dos copias)
1. Entrada
2. Decapsidación
ssRNA dentro del núcleo viral
3. Transcripción reversa
LTR
dsDNA
LTR
Desplazamiento al núcleo
4. Integración en el DNA del hospedador
Hospedador DNA
LTR
Provirus
LTR
Hospedador
5. Transcripción
ssRNA
mRNA vírico y RNA de los virus de la progenie
6. Encapsidación
ssRNA
Nucleocápsida
7. Gemación
Membrana citoplásmica del hospedador
Liberación
Partícula vírica

Figura 9.25 Proceso de replicación de un retrovirus. Para más detalles sobre la conversión de RNA a DNA (etapa 3) *véase* Figura 16.23.

Una de las primeras etapas tras la penetración del genoma RNA en el interior de la célula es la transcripción reversa: es decir, la conversión de RNA en DNA copia usando la enzima transcriptasa reversa presente en el virión. El DNA formado es lineal y bicatenario, y se sintetiza en el citoplasma dentro de la partícula vírica.

Un figura detallada mostrando este complicado esquema se presenta en el Capítulo 16 (*véase* Figura 16.23). El proceso depende de las varias actividades diferentes de la transcriptasa reversa (*véase* Sección 16.14). Sin embargo, la transcriptasa reversa es un DNA polimerasa y como todas las RNA polimerasas necesita un cebador (*véase* Sección 7.5). El cebador para la transcripción reversa de los retrovirus es un *RNA de transferencia (tRNA) celular* específico. El tipo de tRNA cebador depende del virus, y se incorpora al virión en la última célula hospedadora. En el caso del virus del sarcoma de Rous, el tRNA utilizado es el tRNA del *triptófano*.

El proceso global origina un producto final que tiene largas repeticiones invertidas (LTRs), que son más largas que las repeticiones invertidas del propio genoma (Figura 9.24). Esta molécula entera de DNA bicatenario, junto con la proteína integrasa, entra en el núcleo donde se integra en el DNA del hospedador. Las LTRs contienen fuertes promotores transcripcionales y están también implicadas en el proceso de integración. La *integración* del DNA vírico en el genoma del hospedador es análogo a la integración de un transposón en el genoma bacteriano (*véase* Sección 10.11). La integración puede ocurrir en cualquier lugar del DNA celular y, una vez integrado, el elemento, llamado ahora *provirus*, se convierte en un elemento genético estable.

Si se activan los promotores en la LTR adecuada, se transcribe el DNA proviral integrado por una RNA polimerasa originando transcritos que son cubiertos con cap y poliadenilados. Estos transcritos de RNA pueden ser encapsidados en partículas víricas o procesados y traducidos a proteínas víricas. Algunas proteínas virales son sintetizadas inicialmente como una gran proteína *gag*, la cual es cortada por la acción proteolítica para formar las proteínas de la cápsida. Ocasionalmente, la lectura sobrepasa la región *gag* (por inserción de un aminoácido en un codón de parada o por un cambio de fase de lectura por el ribosoma) y conduce a la traducción de *pol*, el gen de la transcriptasa reversa. Otras proteínas se sintetizan a partir de transcritos procesados por corte y empalme.

Cuando las proteínas del virus se han acumulado en cantidades suficientes, puede tener lugar el ensamblaje de la nucleocápsida. El proceso de encapsidación origina la formación de nucleocápsidas, que se mueven hacia la membrana plasmática para el ensamblaje final en partículas víricas con envoltura.

No todos los retrovirus causan cáncer, pero los retrovirus tumorales son bastante comunes. La infección con uno de estos virus puede causar transformación celular, originando la formación de un tumor. ¿Por qué son estos virus oncogénicos? Se cree que poseen un gen transformante, u *oncogén* vírico, que codifica una proteína que causa la transformación celular (*véase* Sección 9.11). Este gen, que corresponde al gen *src* en el virus del sarcoma de Rous (*src* por *sarcoma*) (*véase* Figura 9.24*c*), codifica una proteína que posee actividad quinasa, Las proteínas quinasas causan fosforilación de proteínas, y la fosforilación de proteínas es un mecanismo para regular su actividad (*véase* Sección 8.10).

En las células cancerosas humanas se han detectado genes transformantes análogos a *src*. Sorprendentemente, genes similares se han detectado también en células *normales* (esto es, no cancerosas). Tales secuencias celulares son los proto-oncogenes (*véase* Sección 9.11) y han sido encontrados no sólo en células de mamíferos sino también en células de insectos y levaduras, lo que sugiere que estas secuencias son de capital importancia para la regulación del crecimiento celular. Los retrovirus son capaces de incorporar estas secuencias normales, que luego se alteran y se expresan de manera anormal. De esta manera, los retrovirus son agentes de transferencia de tales genes de célula a célula.

Como se ha mencionado, un retrovirus importante es el VIH, el agente del SIDA. Este virus infecta un tipo específio de célula humana, una clase de linfocito T (T-auxiliares) que es vital para el funcionamiento correcto del sistema inmune. En capítulos posteriores discutiremos aspectos médicos e inmunológicos del SIDA (*véanse* Secciones 25.6 y 26.14).

Dado que los virus no son células pero dependen de las células para su replicación, las enfermedades víricas suponen un problema médico serio; con frecuencia, es difícil evitar que las drogas antivirales causen algún daño a la célula hospedadora. A pesar de esto, se han diseñado estrategias terapéuticas frente a patógenos virales, incluídos los retrovirus. Discutiremos éstas en detalle más adelante, junto con la quimioterapia de otras enfermedades víricas (*véase* Sección 20.10).

✓ 9.12 Revisión de conceptos

Los retrovirus son virus envueltos que tienen ciclos vitales complejos puesto que son virus RNA que se replican por medio de un DNA intermediario. El retrovirus llamado virus de la inmunodeficiencia humana causa el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida. El virión de retrovirus contiene una enzima, la transcriptasa reversa, que copia la información de su RNA genómico en DNA. El DNA se integra en el cromosoma del hospedador a modo de virus temperado. Los retrovirus DNA pueden ser transcritos a mRNA (y nuevo RNA genómico) o pueden permanecer en estado latente.

- ✓ ¿Por qué estos virus se llaman retrovirus?
- ✓ ¿En qué difiere el ciclo de un bacteriófago temperado del de un retrovirus?

9.13 Viroides y priones

Hasta ahora, hemos discutido los principios de la replicación vírica centrándonos en los que infectan bacterias y los que infectan animales. Los bacteriófagos representan sistemas genéticos modelo e infectan procariotas, los principales organismos objeto de este libro. Los virus animales se tratan aquí debido a que causan importantes enfermedades en humanos. Algunos virus vegetales también causan enfermedades en plantas, lo que tiene un impacto considerable en el ser humano. Sin embargo, no es posible cubrir todos los virus en este momento. En el Capítulo 16, analizaremos otros virus de bacterias y animales y algunos virus de plantas.

Tampoco nos hemos referido a los virus de hongos. Estos «virus» no tienen estado extracelular en su ciclo de vida. Aunque algunos son empaquetados en estructuras semejantes a viriones (algunas veces llamados «partículas que asemejan virus») estas partículas no son infecciosas si se liberan de la célula. Por tanto, estos elementos son difíciles de encajar en nuestra definición operativa de virus. Recuérdese que, de acuerdo con nuestra definición, un virus es un elemento genético que subvierte los procesos celulares normales hacia su propia replicación y que tiene una forma infecciosa madura que es típicamente extracelular. Aunque estos «virus» no utilizan mecanismos similares a los de otros virus para infectar, sí son transmitidos por fusión entre células. Este método de transmisión puede deberse a que los hongos tienen paredes celulares muy gruesas o porque la fusión celular en los hongos es un acontecimiento común en la naturaleza. La mayoría de los elementos genéticos se replican benignamente dentro de las células que los poseen. Se sabe que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* contiene elementos de RNA bicatenario y elementos de tipo retroviral.

Existen algunas entidades cuyas propiedades no se adaptan completamente a esta definición y que la mayoría de los científicos actuales no consideraría virus. Sin embargo, están estrechamente relacionadas con los virus y no se consideran plásmidos. Dos de las entidades más importantes son los *viroides* y los *priones*.

Viroides

Los **viroides** son pequeñas moléculas de RNA monocatenario circular que constituyen los patógenos más pequeños conocidos (varían de los 246 nucleótidos del viroide cadang-cadang del coco a los 375 nucleótidos del viroide del exocortis de los cítricos). Los viroides causan un número de enfermedades importantes para las cosechas. La forma extracelular de un viroide es el RNA desnudo, sin cápsida de ningún tipo. Resulta más interesante aun que *la molécula de RNA que no contiene genes que codifican para proteínas*, y, por tanto, el viroide es totalmente dependiente de la función del hospedador para su replicación. Aunque el RNA del viroide es un círculo monocatenario, posee potencialmente una estructura secundaria tan considerable que recuerda a una molécula bicatenaria corta con los extremos cerrados (Figura 9.26). La molécula del viroide parece replicarse en el núcleo de la célula, y su estructura, que recuerda a la del DNA, aparentemente le permite ser replicado por la DNA polimerasa de la célula.

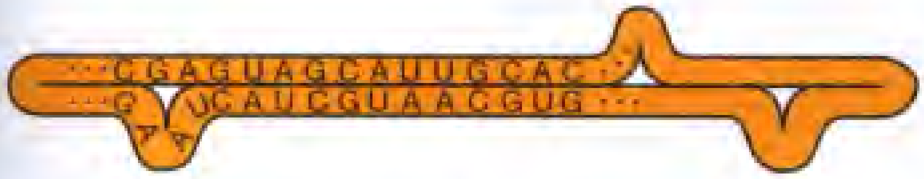


Figura 9.26 Estructura de los viroides mostrando cómo un RNA monocatenario puede formar una estructura aparente de doble cadena por apareamiento de bases intracatenario.

Los viroides se consideran a veces intrones «fugados» y como los intrones que se autoprocesan (*véase* Sección 7.12), parecen ser reliquias de un mundo de RNA (*véase* la discusión sobre «El mundo del RNA» en la Sección 11.2).

Priones

Los **priones** representan el extremo opuesto a los viroides. Tienen una forma extracelular distintiva, pero esta forma extracelular parece estar constituida *exclusivamente por proteína*. Aparentemente, no contiene ácido nucleico, o, si lo tiene, la molécula no es lo suficientemente larga para codificar el único tipo de proteína presente en el prión. Sin embargo, la partícula proteica del prión es infecciosa, y se conocen varios priones que causan una variedad de enfermedades en animales, tales como el prurito lumbar de las ovejas «scrapie», la encefalopatía espongiforme bovina en el ganado vacuno (BSE o «enfermedad de las vacas locas»), y el kuru y la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (CJD) en el hombre. En 1966, se extendió desde Inglaterra una información que indicaba que el prión que causa BSE en las vacas podía infectar a los humanos, dando como resultado una variante de CJD denominada variante CJD o vCJD. Una evidencia posterior pareció confirmar que el prión BSE «saltó» la barrera de la especie; sin embargo, la transmisión parece ser muy ineficiente. A pesar de esta transmisión ineficiente y del hecho de que se hayan identificado relativamente pocos casos en la infección humana, en unos pocos años el vCJD se ha convertido en objeto de preocupación en la salud mundial, con un gran impacto en la industria animal de varios países.

Además de serias enfermedades, la infección del prión origina la producción de más copias de la proteína del prión. A menos que los priones violen el modelo central de flujo de la información genética discutida en el Capítulo 7, esta proteína *debe* ser codificada por un ácido nucleico. De hecho, se ha descubierto que la célula hospedadora contiene en uno de sus cromosomas un gen que codifica una proteína muy similar a la proteína del prión. La proteína del hospedador se produce en condiciones normales y se encuentra principalmente en las neuronas. Aparentemente, la llegada del prión modifica esta proteína del hospedador durante o después de su síntesis. La modificación consiste en un modelo alternativo de plegamiento que hace que la proteína pierda sus propiedades normales, haciéndose parcialmente resistente a proteasas e insoluble. Por tanto, los priones no sólo alteran la función de las enzimas del hospedador, sino que de alguna manera hacen que el gen normal del hospedador produzca más copias de la propia proteína patogénica.

En 1977, el científico estadounidense Stanley B. Pruisner ganó el Premio Nobel por su trabajo pionero sobre estas enfermedades y las proteínas priones. Existe ahora un modelo de estudio de las enfermedades causadas por priones que resulta mucho más fácil de utilizar que seguir la enfermedad en mamíferos. Este sistema modelo es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Se ha demostrado que dos características de la levadura son transmitidas por una proteína «infecciosa» tipo prión. Una de ellas se refiere al fenotipo PSI^+. Las cepas PSI^- (normal) sintetizan una proteína llamada sup35, que está implicada en la síntesis precisa de proteínas. En las cepas PSI$^+$ la proteína no funciona correctamente, a pesar de que el gen es normal. En estas cepas la proteína está mal plegada. Este plegamiento erróneo está causado por una proteína mal plegada preexistente (de aquí la naturaleza infecciosa del proceso) y un chaperón molecular. Esta situación parece ser idéntica a la encontrada en las enfermedades de mamíferos producidas por priones.

La existencia de viroides y los priones supone algo más que una extensión de nuestra definición de los virus. También demuestran tanto las inesperadas vías que los elementos genéticos pueden utilizar para replicarse como los sorprendentes modos por los que pueden alterar la función de las células hospedadoras. Por supuesto, también nos interesan por las enfermedades que causan.

✓ 9.13 Revisión de conceptos

Los viroides son moléculas de RNA monocatenarios circulares que no codifican proteínas y son completamente dependientes de las enzimas codificadas por el hospedador. Son los patógenos más pequeños conocidos. A diferencia de los virus, su forma extracelular es la misma que su forma intracelular, y no tienen proteína de la cubierta. Los priones tienen una forma extracelular que contiene proteína, pero no contiene ácido nucleico alguno que la codifique. El gen que codifica la proteína del prión se encuentra en la célula hospedadora, y el prión modifica de alguna manera su producto proteico.

Preguntas de repaso

1. Defina el término *hospedador* en relación con los virus.
2. Defina *virus*. ¿Cuáles son las características mínimas para cumplir con esa definición?
3. Bajo algunas condiciones, es posible obtener proteínas de la cubierta (*cápsida*) carentes de ácido nucleico. Bajo el microscopio electrónico estas cápsidas parecen similares a los viriones completos. ¿Qué indica este hecho acerca del papel del ácido nucleico del virus en el proceso de ensamblaje? ¿Sería de esperar que tales partículas fueran infecciosas? ¿Por qué?
4. Escriba un párrafo describiendo los procesos que ocurren en una placa de agar cubierta con un césped de bacterias cuando una única partícula de bacteriófago causa la formación de una *placa de bacteriófago*.
5. ¿Por qué se habla generalmente de unidades formadoras de placa (pfu)/ml en lugar de virus/ml?
6. Describa cómo una *endonucleasa de restricción* podría desempeñar un papel en la resistencia a la infección por bacteriófago. ¿Por qué una endonucleasa de restricción podría jugar tal papel mientras que una DNasa inespecífica no?
7. El proceso de replicación de un virus puede dividirse en cinco etapas. Describa los procesos asociados a cada una de ellas.
8. Algunas células pueden ser *susceptibles* de ser infectadas por un virus, a pesar de que pueden ser *no permisivas* para ese virus. Explique por qué.
9. ¿Por qué tanto el ciclo de vida como el virión de un virus RNA con banda positiva suelen ser más simples que los de un virus RNA con banda negativa?
10. Muchos virus animales con genomas dsDNA replican sus genomas en el núcleo de la célula hospedadora. ¿Por qué utilizan esta estrategia de replicación?
11. Una bacteria que carece de la proteína de la membrana externa responsable del transporte de maltosa es *resistente* a la infección de lambda. Un lisógeno de lambda es *inmune* a la infección de lambda. Describa la diferencia funcional entre resistencia e inmunidad. Explique cómo se dan estas condiciones en los ejemplos descritos.
12. Muchos de los virus que hemos mencionados tienen genes *tempranos* y genes *tardíos*. ¿Cuál es el significado de estos dos grupos de genes? ¿Qué tipo de proteínas suelen ser codificadas por los genes tempranos? ¿Y por los genes tardíos? Describa cómo se controla la expresión de los genes tardíos en cualquiera de los tres virus que hemos considerado.
13. El genoma del bacteriófago T4 es *circularmente permutado* y *terminalmente redundante*. Describa lo que significa cada uno de estos dos términos.
14. Generalmente, el RNA de transferencia es usado en la traducción. Sin embargo, también juega un papel en la replicación del ácido nucleico retroviral. Explique este papel.
15. *Provirus* y *profago* significan casi lo mismo. Dé una definición de estos términos. ¿Cuándo se usa generalmente *provirus* y cuándo *profago*?
16. ¿Cuáles son las similitudes y las diferencias entre priones, virus y viroides?

Ejercicios prácticos

1. ¿Puede suponer alguna ventaja para un virus tener una fase extracelular metabólicamente inerte en lugar de una metabólicamente activa?
2. ¿Cuál es la causa de que las placas víricas que aparecen en un césped de bacterias detengan su crecimiento?
3. Una característica de los *bacteriófagos temperados* es que producen placas túrbidas más que placas claras en céspedes de bacterias ¿Puede imaginar la razón de esto? (Recuerde el proceso por el que se produce una placa bacteriana.)
4. Existen tres genes de lambda que cuando se inactivan convierten a un lambda temperado en un virus virulento. ¿Cuáles son estos genes y cómo funcionan normalmente?
5. La Figura 9.18 muestra dos promotores, P_R y P_L a cada lado del gen *cro*. Ambos transcriben a través del gen *cro*, pero sólo el transcrito desde P_R puede ser traducido para originar la proteína Cro. Explique por qué.
6. La proteína cIII de lambda se producirá en cantidades relativamente altas en una célula si es infectada simultáneamente por más de un virión de lambda (debido a que se expresarán simultáneamente las múltiples copias del cromosoma de lambda). Altos niveles de la proteína cIII conducen a la lisogenia (Vd. debe ser capaz de explicar la causa). Desde el punto de vista del virus, la «decisión» de cambiar el ciclo lisogénico en estas condiciones es acertada. Explique por qué.
7. Conociendo el tipo de RNA presente en el genoma de los retrovirus se podría predecir que el virión no lleva enzima alguno. Explique por qué podría hacerse esta predicción y la razón por la que sería errónea en este caso.
8. Los promotores de los mRNAs que codifican proteínas tempranas tienen a veces secuencias muy diferentes de las de los promotores de los mRNAs que codifican las proteínas tardías del mismo virus. Explique por qué. (*Sugerencia*: ¿qué tipo de RNA polimerasa debe reconocer los promotores «tempranos»?)
9. Los *agentes quimioterapéuticos* carecen de efecto en la mayoría de las enfermedades víricas. A partir de su conocimiento de los estadios de la replicación vírica, explique por qué cree que se produce esta situación.
10. En las levaduras hay varios elementos genéticos que presentan la mayoría de las características de los virus, incluyendo la formación de partículas semejantes a virus que contienen el genoma del elemento. Sin embargo, estos elementos genéticos no tienen un estadio extracelular en su ciclo de vida, sino que se transfieren por fusión celular. Intente escribir una definición simple de la palabra «virus» que incluya estos elementos pero que no incluya a los plásmidos. (Nótese que los plásmidos pueden ser también transferidos de célula a célula, *véase* Sección 10.9.)

Para entender el crecimiento, desarrollo y reproducción de un organismo es necesario entender el conjunto de sus genes y su funcionamiento. Para adquirir este conocimiento es necesario que podamos manipular su material genético. Existe un amplio conjunto de técnicas, tanto las que operan dentro del organismo (*in vivo*) como las que pueden realizarse en el tubo de ensayo (*in vitro*) para estudiar la genética de los procariotas. Las mutaciones que se producen en los genes de un organismo pueden conducir a una amplia variedad de cambios. Algunas mutaciones producen alteraciones en las características de un organismo que son fáciles de reconocer, como las que afectan al color de las colonias de *Halobacterium*, un miembro de las *Archaea*, tal como se muestra aquí.

10

GENÉTICA BACTERIANA

I MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN 265
10.1 Mutaciones y mutantes 266
10.2 Bases moleculares de la mutación 268
10.3 Mutagénesis 271
10.4 Mutagénesis y carcinogénesis: el test de Ames 275
10.5 Recombinación genética 276
II TÉCNICAS DE GENÉTICA BACTERIANA: *IN VIVO* 278
10.6 Transformación genética 278
10.7 Transducción 283
10.8 Plásmidos 286
10.9 Conjugación y movilización del cromosoma 291
10.10 Complementación 296
10.11 Transposones y secuencias de inserción 297
III TÉCNICAS DE GENÉTICA BACTERIANA: *IN VITRO* 301
10.12 Enzimas de restricción 302
10.13 Secuenciación y síntesis de DNA 305
10.14 Clonación molecular 307
10.15 Los plásmidos como vectores de clonación 308
10.16 El bacteriófago lambda como vector de clonación 310
10.17 Amplificación del DNA: la reacción en cadena de la polimerasa 312
10.18 Mutagénesis *in vitro* y dirigida 314
IV EL CROMOSOMA BACTERIANO 316
10.19 Mapa genético del cromosoma de *Escherichia coli* 316

Glosario

Auxotrofo	un organismo que ha desarrollado un requerimiento nutricional mediante mutación
Clonación molecular	aislamiento e incorporación de un fragmento de DNA en un vector en el que puede replicarse
Clonación por shot-gun	fabricación de una genoteca utilizando fragmentos de DNA obtenidos al azar
Conjugación	transferencia de genes de una célula procariótica a otra por un mecanismo que implica contacto célula-célula y un plásmido
Disrupción génica	uso de técnicas genéticas para inactivar un gen mediante la inserción en su interior de un fragmento de DNA conteniendo un marcador fácilmente seleccionable. El fragmento insertado se denomina *casete*, y el proceso de inserción *mutagénesis por casete*
DNA sintético	molécula de DNA sintetizada químicamente en el laboratorio
Electroporación	el uso de un pulso eléctrico para inducir a las células a tomar DNA libre
Elemento transponible	elemento genético que tiene la capacidad de moverse (transponerse) de un sitio de un cromosoma a otro
Enzima de restricción	enzima que reconoce y rompe DNA de doble cadena en sitios específicos de la secuencia de DNA
Escrutinio (screening)	cualquiera de los procedimientos que permite clasificar organismos por el fenotipo o el genotipo, pero permite el crecimiento de todos los posibles
Fenotipo	las características observables de un organismo
Genotipo	constitución génica precisa de un organismo
Hibridación	formación de un dúplex de ácido nucleico con bandas que proceden de diferentes fuentes mediante apareamiento de bases complementarias
Mapa genético	ordenación de genes en un cromosoma
Mutágenos	agentes que causan mutación
Mutación	cambio heredable en la secuencia de bases del genoma de un organismo
Mutagénesis dirigida	técnica por la que puede construirse *in vitro* un gen con una mutación específica
Mutación puntual	mutación que afecta sólo a un par o unos pocos pares de bases
Mutante	organismo cuyo genoma lleva una mutación
Plásmido	elemento genético extracromosomal que no tiene forma extracelular
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	método usado para amplificar una secuencia específica de DNA *in vitro* por repetidos ciclos de síntesis usando cebadores específicos y DNA polimerasa
Recombinación	proceso por el que parte o todas las moléculas de DNA de dos fuentes separadas se intercambian o se juntan en una unidad
Selección	disposición de los organismos bajo condiciones que favorecen el crecimiento de un determinado genotipo
Sonda	ver *sonda de ácido nucleico*
Sonda de ácido nucleico	una banda de ácido nucleico que puede marcarse y utilizarse para hibridar con una molécula complementaria en una mezcla de ácidos nucleicos
Transducción	transferencia de genes del huésped de una célula a otra por medio de un virus
Transformación	transferencia de genes bacterianos que implica DNA libre (para uso alternativo, *véase* Capítulo 8)
Transposón	un tipo de elemento transponible que lleva genes adicionales a los implicados en la transposición.
Vector de clonación	elemento genético en el que los genes pueden replicarse y recombinarse

Ahora que hemos visto las principales características de la biología molecular de células y virus, podemos centrarnos en la discusión de aspectos específicos de la genética microbiana. En este capítulo, presentaremos los principios básicos y las técnicas de la genética bacteriana.

Primero, comentaremos la mutación y la recombinación genética y luego explicaremos cómo el material genético puede transferirse de un organismo a otro. La transferencia de material genético puede producirse de diversos modos, y si va acompañada de recombinación genética, puede producir profundos cambios en el organismo. Finalmente, comentaremos algunas de las técnicas básicas de la manipulación de DNA *in vitro* que han revolucionado el estudio de la genética de todos los organismos, de bacterias a humanos.

I MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN

La **mutación** es un cambio hereditario en la secuencia de bases del ácido nucleico que constituye el genoma de un organismo. La **recombinación genética** es el proceso por el que los elementos genéticos contenidos en dos genomas separados se juntan en una unidad. A través de este mecanismo pueden surgir nuevas combinaciones de genes incluso en ausencia de mutación. Puesto que los elementos que se han asociado pueden capacitar al organismo a llevar a cabo alguna función nueva, la recombinación genética puede dar como resultado la adaptación a cambios ambientales. Mientras que la mutación origina generalmente un pequeño cambio genético en una célula, la recombinación suele acarrear cambios mucho mayores. Genes enteros, grupos de genes, o incluso cromosomas enteros, pueden ser transferidos entre organismos.

Los procariotas, a diferencia de muchos eucariotas, no se reproducen sexualmente (*véase* Sección 14.6). Sin embargo, en procariotas existen mecanismos de intercambio genético que, aunque considerablemente diferentes de los implicados en la reproducción sexual de los eucariotas, permiten tanto la transferencia de genes como su recombinación.

Para detectar intercambio genético entre dos organismos es necesario emplear *marcadores genéticos* cuya transferencia pueda ser detectada. A estos efectos se utilizan cepas genéticamente alteradas, siendo estas alteraciones debidas a una o unas pocas mutaciones en el DNA del organismo. Estas mutaciones pueden implicar cambios en uno o unos pocos pares de bases o incluso la inserción o deleción de genes enteros. Comenzaremos este capítulo sobre genética microbiana considerando el mecanismo de la mutación y las propiedades de los microorganismos mutantes como preludio a nuestra discusión sobre intercambio genético.

10.1 Mutaciones y mutantes

Como ya se ha indicado, una mutación es un cambio hereditario en la secuencia de bases del ácido nucleico genómico de un organismo. En todas las células, este ácido nucleico es DNA bicatenario (*véase* Sección 7.1). Una cepa que lleva este tipo de cambio se denomina un **mutante.** Por definición, un mutante difiere de su cepa parental en el **genotipo,** es decir, en el conjunto de genes del organismo. Pero, además, las propiedades observables del mutante, su **fenotipo,** pueden también estar alteradas en relación con la cepa parental. Uno se refiere a este fenotipo alterado como *fenotipo mutante.* Normalmente, una cepa aislada de la naturaleza se considera una *cepa silvestre.* Se pueden obtener mutantes de una cepa silvestre o de una cepa derivada de ésta, por ejemplo, de otro mutante.

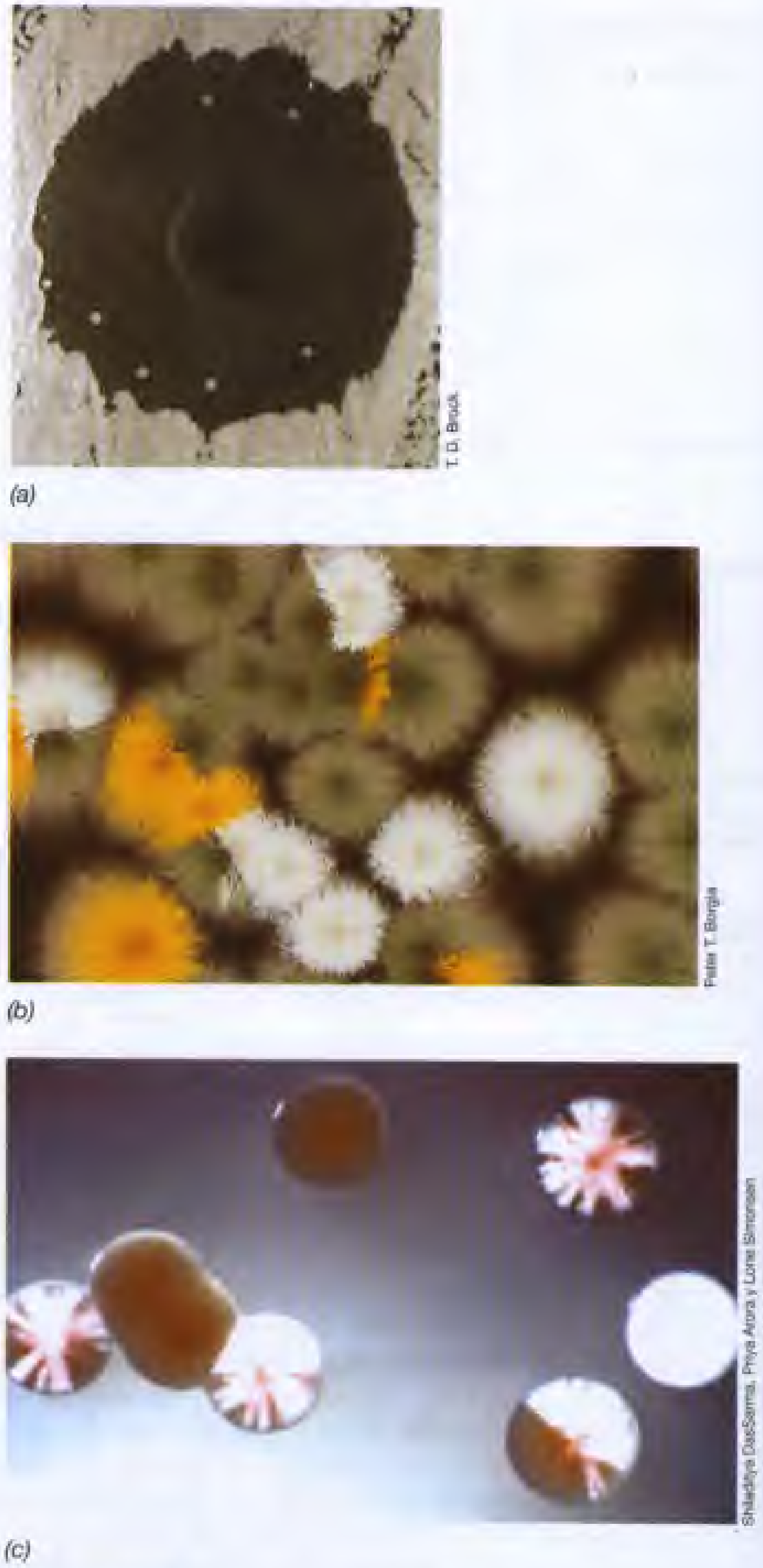
Determinación del genotipo y del fenotipo

Dependiendo de la mutación, un mutante puede o no mostrar un fenotipo diferente del de su cepa parental. Por convención, en genética bacteriana, el *genotipo* de un organismo se designa por tres letras minúsculas seguidas de una mayúscula (todas en cursiva) que indican el gen particular implicado. Por ejemplo, el gen *hisC* de *Escherichia coli* codifica para una proteína que se denomina HisC. En este caso, esta proteína (una enzima de la ruta biosintética de la histidina) corresponde a la histidinol-fosfato aminotransferasa, que describe su actividad enzimática. Sin embargo, algunas proteínas, como RecA (*véanse* Secciones 9.10, 10.3 y 10.5), no tienen otros otros nombres porque sus funciones enzimáticas son difíciles de describir en pocas palabras. Las mutaciones en gen *hisC* se designan como *hisC1*, *hisC2*, y así sucesivamente, en referencia al orden en que fueron obtenidas las cepas mutantes.

El *fenotipo* de un organismo se designa por una letra mayúscula seguida de dos letras minúsculas con una signo más o menos como superíndice para indicar la presencia o ausencia de tal propiedad. Por ejemplo, una cepa His^{+} de *E. coli* es capaz de sintetizar su propia histidina, mientras que un His^{-} no. Las mutaciones en el gen *hisC* pueden conducir a un fenotipo His^{-} si eliminan la función del producto del gen.

Aislamiento de mutantes

Virtualmente, cualquier característica de un organismo puede ser cambiada por mutación. Sin embargo, algunas mutaciones son *seleccionables*, confiriendo algún tipo de ventaja a los organismos que la poseen, mientras que otras son *no seleccionables*, incluso aunque causen un cambio claro en el fenotipo de un organismo. Un ejemplo de mutación no seleccionable es la pérdida de color de un organismo pigmentado (Figura 10.1*b*). Tales colonias no tienen por lo general ventajas ni desventajas sobre las colonias pigmen-



T. D. Brock

Peter T. Borgia

Shiladitya DasSarma, Priya Arora y Lone Simonsen

Figura 10.1 Observación de varios tipos de mutantes. (a) Desarrollo de mutantes resistentes a antibióticos dentro de la zona de inhibición de un ensayo de antibiótico por el método de disco. (b) Mutantes pigmentados y no pigmentados del hongo *Aspergillus nidulans*. El tipo silvestre tiene un pigmento verdoso. Los mutantes blancos o incoloros no producen pigmento, mientras que los mutantes amarillos no pueden convertir el pigmento que fabrican al de color normal. (c) Colonias de mutantes de una especie de *Halobacterium*, un miembro de *Archaea*. Las colonias que aparecen blancas son del tipo silvestre. Las colonias naranja/marrones son mutantes que han perdido las vesículas (*véase* Sección 4.14). Las colonias sectoreadas son el resultado de las actividades mutagénicas de elementos transponibles (*véase* Sección 10.11).

tadas cuando crecen en placas de agar (puede haber una ventaja selectiva, sin embargo, para los organismos pigmentados en la naturaleza). Podemos detectar tales mutaciones tan sólo examinando un gran número de colonias y buscando las «diferentes», un proceso denominado **rastreo** (*screening*). Nótese que el color aparente de una colonia no tiene por qué ser debido a la producción de un pigmento. Las colonias mutantes de *Halobacterium* que carecen de vesículas de gas (*véase* Sección 4.14) transmiten luz de forma diferente a las colonias silvestres y parecen ligeramente diferentes en las placas (Figura 10.1*c*).

Los mutantes no seleccionables deben detectarse por rastreo de grandes poblaciones de organismos, y los fenotipos mutados pueden no ser tan fáciles de reconocer como la diferencia entre colonias pigmentadas y no pigmentadas. Por una parte, una mutación *seleccionable* confiere al mutante una ventaja bajo ciertas condiciones ambientales, de manera que la progenie del mutante pueda ser capaz de superar el crecimiento de la cepa parental y reemplazarla. Un ejemplo de mutación seleccionable es la resistencia a una droga: un mutante resistente a un antibiótico puede crecer en presencia de concentraciones de antibiótico que inhiben o matan la cepa parental (Figura 10.1*a*). Sin embargo, el fenotipo sensible al antibiótico no puede seleccionarse directamente eliminando el antibiótico del medio. Es relativamente fácil detectar y aislar los mutantes seleccionables escogiendo las condiciones ambientales apropiadas. Por tanto, la **selección** es un instrumento genético muy poderoso que permite el aislamiento de un solo mutante a partir de una población que contiene millones o incluso miles de millones de organismos parentales.

Aunque el rastreo es siempre más tedioso que la selección, para ciertos tipos de mutaciones existen métodos que permiten el rastreo de gran número de colonias. Por ejemplo, se pueden detectar mutantes nutricionales por la técnica de la **réplica en placa** (Figura 10.2*a*). A partir de una placa original, y con el uso de un terciopelo o filtro de papel estéril, se hace una impresión en otra placa de agar que carezca del nutriente en cuestión. Las colonias del tipo parental crecerán normalmente, mientras las del mutante no. Por tanto, la incapacidad de una colonia para crecer en la placa réplica (Figura 10.2*b*) es una señal de que es un mutante. La colonia de la placa maestra que corresponda al espacio vacío en la placa réplica (Figura 10.2*b*) puede ser recogida, purificada y caracterizada. Un mutante nutricional que tenga un requerimiento por un factor de crecimiento se suele denominar **auxotrofo**, y la cepa parental de la que deriva se denomina **prototrofo**. Por ejemplo, mutantes de *Escherichia coli* con fenotipo His^- se llaman *auxotrofos para la histidina*. Aunque es de gran utilidad, la réplica en placa es un proceso de rastreo que puede resultar muy laborioso para el aislamiento de mutantes.

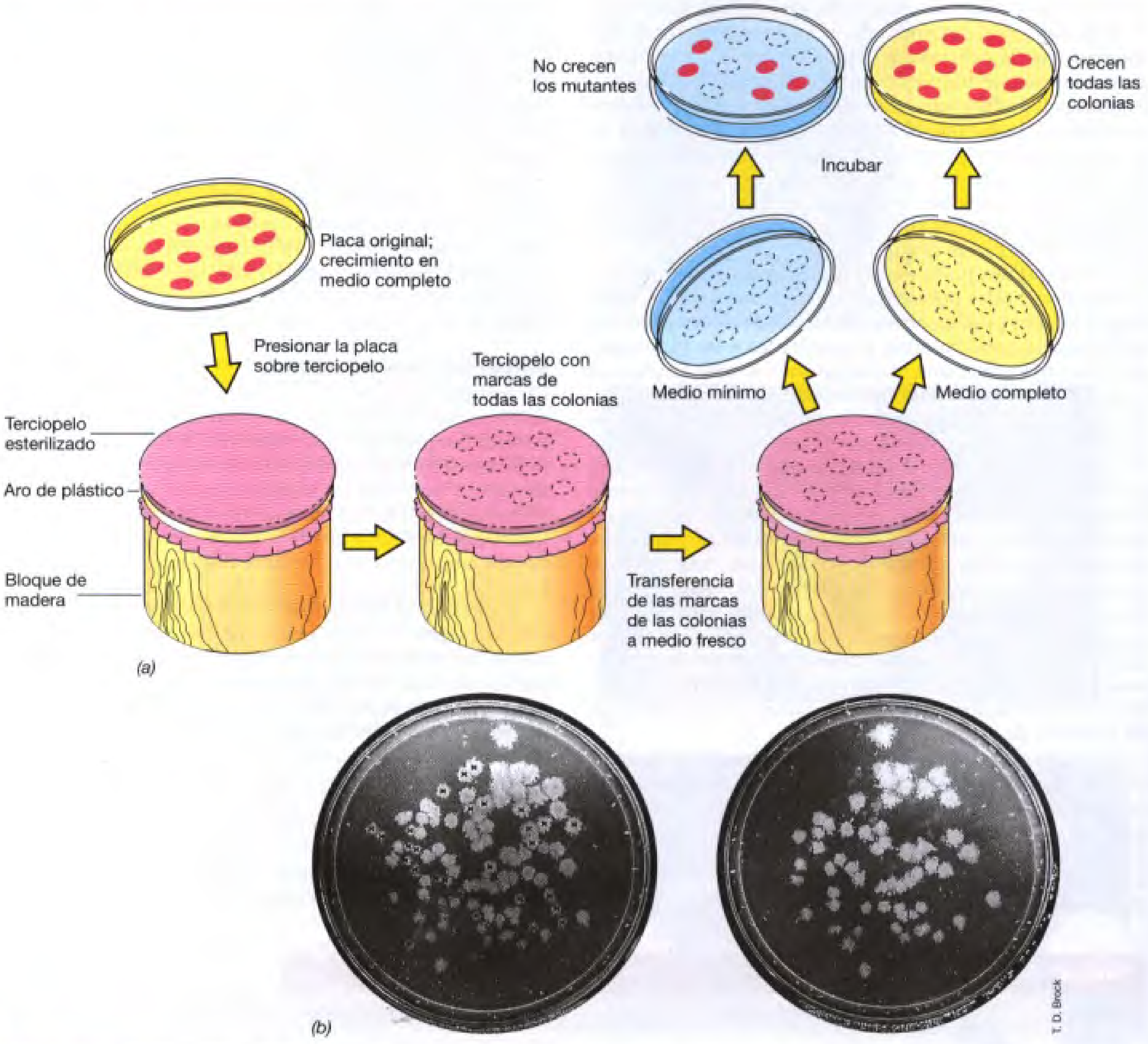
Selección con penicilina

Un método ingenioso y ampliamente usado para aislar auxotrofos es el **método de selección con penicilina**. Por lo general, los mutantes que requieren factores de crecimiento tienen desventajas competitivas respecto a las células parentales, y no existe un método directo para aislarlas. Sin embargo, la penicilina mata solamente a las células que están *creciendo*, y si se añade a una población que está creciendo en un medio que carece del factor de crecimiento requerido por el mutante deseado, morirán las células parentales sin que resulten afectadas las células del mutante que no crecen. Así, tras una incubación preliminar en ausencia del factor de crecimiento en un medio con penicilina, la población se lava para eliminar el antibiótico y se transfiere a placas con el factor de crecimiento. Entre las colonias que crecen (incluyendo algunas células silvestres que han escapado a los efectos de la penicilina) deben encontrarse algunos mutantes para ese factor de crecimiento. La selección con penicilina es un tipo de *selección negativa*; la selección no favorece al mutante sino que perjudica al tipo parental o silvestre.

En la Tabla 10.1, se indican los tipos de mutantes más comunes y los métodos para detectarlos.

TABLA 10.1 Tipos de mutantes

Fenotipo	Naturaleza del cambio	Detección del mutante
Auxotrofo	Pérdida de una enzima en una vía biosintética	Incapacidad para crecer en medio sin el nutriente
Sensible al frío	Alteración de una proteína esencial de modo que se inactiva a baja temperatura	Incapacidad para crecer a una temperatura baja (por ejemplo, 20°C) a la que crece normalmente
Resistente a drogas	Alteración en la permeabilidad a la droga modificación de su diana, o detoxificación del compuesto	Crecimiento en medio que contiene una concentración inhibitoria de la droga
No capsulado	Pérdida o modificación de la cápsula	Colonias pequeñas y rugosas en lugar de grandes y lisas
Inmóvil	Pérdida de flagelos; flagelos no funcionales	Colonias compactas en vez de planas y extendidas
No pigmentado	Pérdida de una enzima de la ruta biosintética que ocasiona la pérdida de uno o más pigmentos	Presencia de un color diferente o falta de color
Colonia rugosa	Pérdida o cambio en el lipopolisacárido de la membrana externa	Colonias granulares e irregulares en lugar de lisas y brillantes
Fermentación de azúcares	Pérdida de una enzima de una vía degradativa	Pérdida de cambio de color en medio conteniendo el azúcar y un indicador de pH
Sensible a temperatura	Alteración de una proteína esencial de modo que se hace sensible a la temperatura	Incapacidad para crecer a una temperatura que normalmente permite el crecimiento (por ejemplo, 40°C) pero aún capaz de crecer a temperaturas más bajas (por ejemplo, 30°C)
Resistencia a virus	Pérdida del receptor del virus	Crecimiento en presencia de grandes cantidades de virus


No crecen los mutantes
Crecen todas las colonias
Incubar
Placa original; crecimiento en medio completo
Presionar la placa sobre terciopelo
Terciopelo con marcas de todas las colonias
Medio mínimo
Medio completo
Terciopelo esterilizado
Aro de plástico
Bloque de madera
Transferencia de las marcas de las colonias a medio fresco
(a)
(b)

T. D. Brock

Figura 10.2 (a) Método de la réplica en placa para la detección de mutantes nutricionales. (b) Mutantes nutricionales detectados por el método de la réplica en placa. La fotografía de la izquierda muestra la placa original. Las colonias que no aparecen en la placa replicada están marcadas con una X. La placa réplica carecía de un nutriente (leucina) que estaba presente en la placa original. Por tanto, las colonias marcadas con una X son auxotrofos para la leucina.

✓ 10.1 Revisión de conceptos

La mutación, un cambio heredable en el DNA, puede originar un cambio en el fenotipo. Las poblaciones seleccionables son las que confieren al mutante una ventaja en su crecimiento bajo determinadas condiciones ambientales, y son especialmente útiles en investigación genética.

- ✓ Distinga entre *mutación* y *mutante.*
- ✓ Distinga entre *rastreo* y *selección.*

10.2 Bases moleculares de la mutación

Como hemos mencionado, las mutaciones surgen en las células a causa de cambios en la secuencia de bases del material genético de un organismo. En muchos casos, las mutaciones conducen a cambios fenotípicos en el organismo; en la mayoría de las ocasiones estos cambios son perjudiciales o neutros, pero a veces ocurren también cambios que son beneficiosos.

Las mutaciones pueden ser espontáneas o inducidas. Las **mutaciones espontáneas** pueden surgir como consecuencia de la acción de la radiación natural (por ejemplo, rayos cósmicos) que alteran la estructura de las bases del DNA. Las mutaciones espontáneas pueden ocurrir durante la replicación, como resultado de errores en el apareamiento de las bases, originando cambios en el DNA replicado.

Las mutaciones que implican un par de bases (o unos pocos pares), se conocen generalmente como **mutaciones puntuales**. Las mutaciones puntuales pueden ser resultado de *sustituciones de pares de bases* en el DNA o de la inserción o deleción de un par de bases (*microinserciones* o *microdeleciones*). Como en toda mutación, el cambio fenotípico derivado de una mutación puntual depende de dónde ocurra exactamente la mutación en el gen, qué cambio de nucleótido tuvo lugar, y qué producto codifica dicho gen.

Sustituciones de pares de bases

Si dentro de la región codificante de un gen que codifica para una proteína ocurre una mutación puntual, cualquier cambio en el fenotipo de la célula es probablemente consecuencia de un cambio en la *secuencia* de la proteína producida. La Figura 10.3 muestra diversas sustituciones de pares de bases que pueden ocurrir en una estrecha región del DNA de un gen que codifica para una proteína. El error en el DNA se transcribe al mRNA, y este RNA erróneo se usa a su vez como molde en la traducción a proteína. (Puesto que sólo se utiliza una de las bandas del DNA como molde para el mRNA, un par de bases AT no significa lo mismo que un par TA.) El código triplete que dirige la inserción de un aminoácido a través de un RNA de transferencia será, por tanto, incorrecto. ¿Cuáles son las consecuencias de las sustituciones de pares de bases?

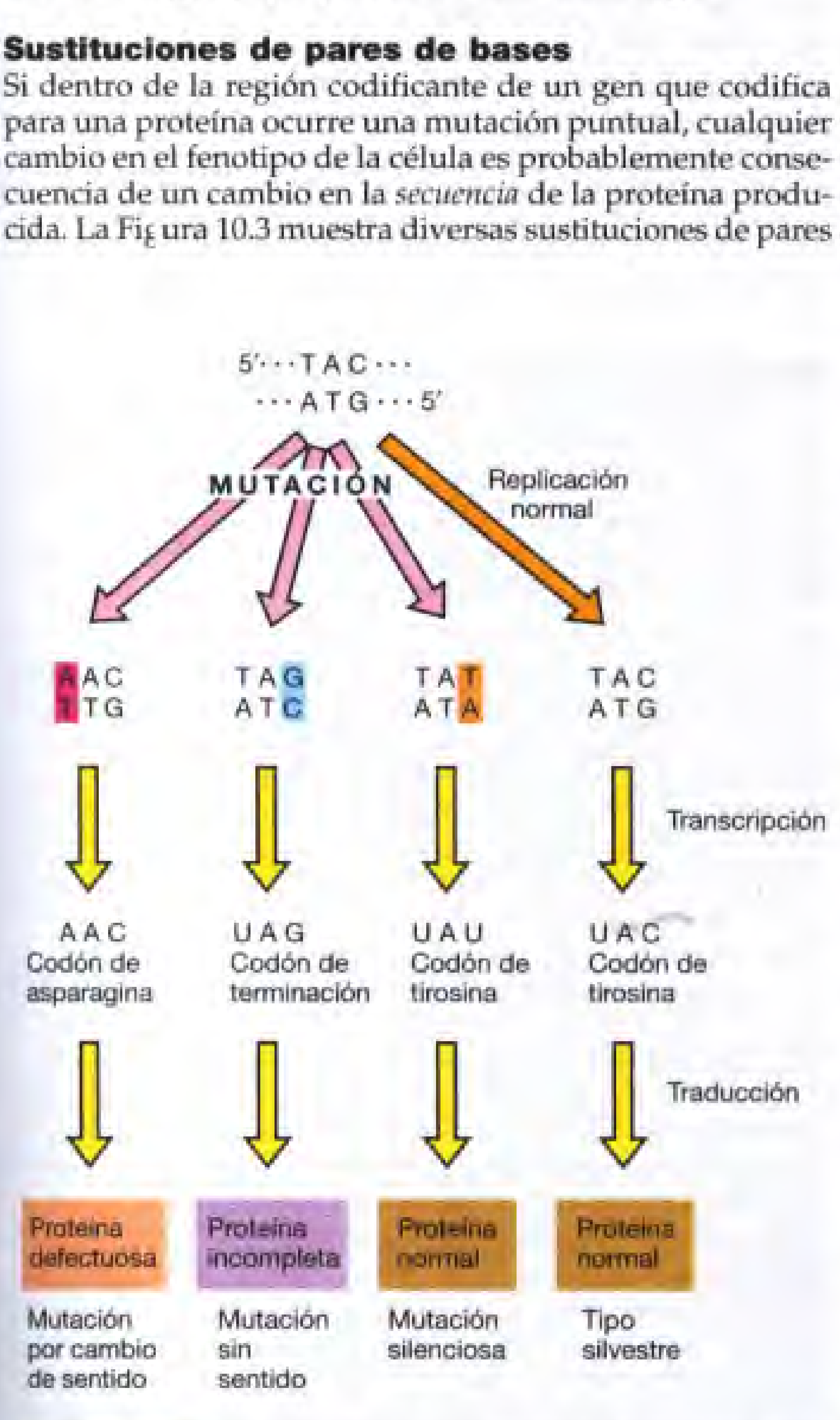


Figura 10.3 Posibles efectos de sustituciones de pares de bases en un gen que codifica una proteína: tres proteínas diferentes originadas por cambios en el DNA de un único codón del DNA.

Para interpretar los resultados de la mutación, debemos recordar primero que el código genético es degenerado (*véase* Sección 7.13). Por ello, no todas las mutaciones en los genes que codifican proteínas causan cambios en las proteínas. Esto se ilustra en la Figura 10.3, que muestra varios resultados posibles cuando el DNA que codifica exclusivamente un *codón de tirosina* sufre una mutación. Como se indica, un cambio en el RNA de UAC a UAU no tendría efecto porque UAU es también un codón de tirosina. Las mutaciones que originan este tipo de cambio se denominan **mutaciones silenciosas**. Nótese que la mutación silenciosa casi siempre ocurre en la tercera base del codón (arginina y leucina pueden tener también mutaciones silenciosas en la primera posición). Como se vio en el Capítulo 7 (*véase* Tabla 7.3), cambios en la primera o segunda base del triplete conducen con mucha más frecuencia a cambios significativos en la proteína. Por ejemplo, un simple cambio de base de UAC a AAC (Figura 10.3) ocasiona un cambio en la proteína de tirosina a asparragina. Esto se conoce como una **mutación con sentido erróneo**, porque el «sentido» químico (secuencia de aminoácidos) del polipéptido resultante ha cambiado. Si el cambio ocurriera en una posición crítica en la cadena polipeptídica, la proteína podría ser inactiva o tener actividad reducida. Sin embargo, no todas las mutaciones que ocasionan la sustitución de un aminoácido por otro conducen necesariamente a proteínas no funcionales. El resultado depende del lugar de la cadena polipeptídica en el que ha ocurrido la sustitución y cómo afecta al plegamiento y a la actividad catalítica de la proteína. Una mutación con sentido erróneo puede conducir a una enzima que es sensible a la temperatura. Por ejemplo, se conocen **mutantes bacterianos sensibles a la temperatura** que funcionan normalmente a 30°C pero no pueden crecer a 40°C, aunque el tipo silvestre crezca bien a las dos temperaturas. Tales sustituciones se denominan también **condicionalmente letales** porque la bacteria no puede crecer bajo una condición pero puede hacerlo bajo otra. Los fenotipos sensibles a la temperatura ocurren frecuentemente porque la proteína mutante puede mantener su conformación correcta a la temperatura más baja pero se despliega parcialmente (desnaturaliza) a la temperatura más alta.

Otro resultado posible de la sustitución de pares de bases es la formación de un *codón de parada*, causaría la terminación prematura de la traducción, originando una proteína incompleta que, casi seguro, no sería funcional (Figura 10.3). Las mutaciones de este tipo se llaman **mutaciones sin sentido** porque el cambio es de un codón para un aminoácido (codón con sentido) a un codón de terminación (codón sin sentido). A menos que la mutación sin sentido ocurra muy cerca del final del gen, la proteína incompleta será totalmente inactiva.

Mutaciones por desfase

Como el código genético se lee desde un extremo en bloques consecutivos de tres bases, cualquier deleción o inserción de un par de bases origina un **desfase en el marco de lectura** y la traducción del gen es completamente alterada (Figura 10.4). A menudo, puede lograrse la restauración parcial de la función de un gen mediante la inserción de otro par de bases cerca de la delecionada (una especie de mutación supresora; *véase* más adelante). Después de la corrección, la proteína formada puede tener algo de actividad biológica o incluso ser completamente normal dependiendo de los aminoácidos codificados por la región defectuosa.

Es importante recordar que las microinserciones o microdeleciones sólo son mutaciones por desfase si tienen lugar en la parte que incluye el marco de lectura de un gen que codifica una proteína. La inserción de una sola base en el promotor de un gen podría originar un cambio dramático en la capacidad funcional del gen (debido al incremento o disminución de su expresión o a cambios en su regulación), pero no sería una mutación por desfase. (De manera similar, sustituciones de pares de bases que no estén dentro de marcos de lectura, no son mutaciones de sentido erróneo o mutaciones sin sentido.)

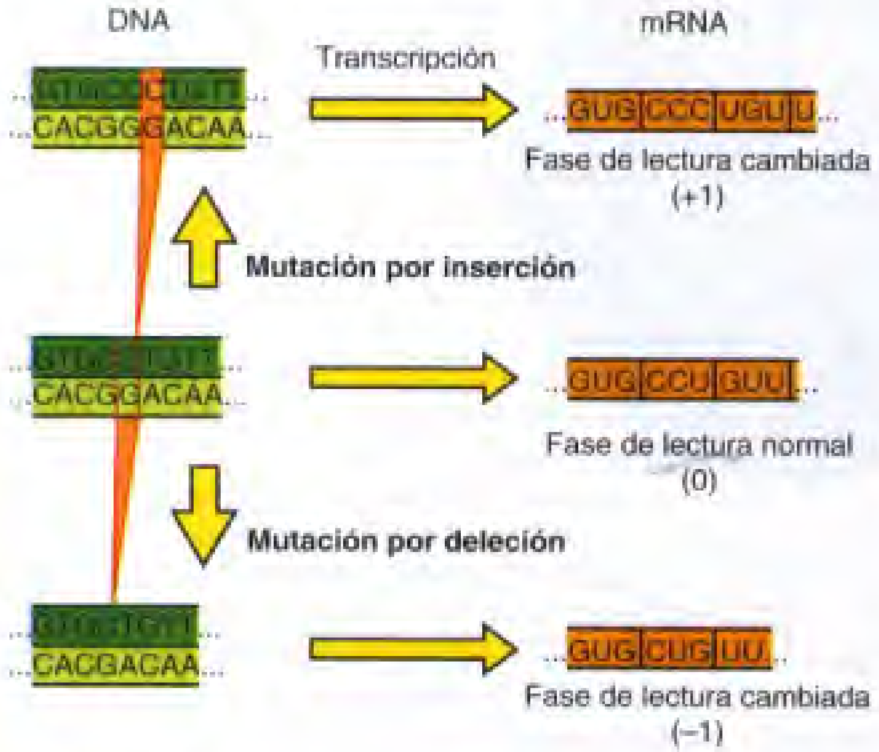


Figura 10.4 Cambios en la fase de lectura del RNA mensajero causados por mutaciones por inserción o deleción en el DNA. La fase de lectura en el RNA se establece por el ribosoma que comienza en el extremo 5′ (hacia la izquierda en la figura) y procede en unidades de tres bases (codones, *véanse* Secciones 7.13 y 7.15). La fase de lectura normal se indica como la fase 0, la que carece de una base como fase −1, y la que tiene una base extra como la fase +1. Para determinar los efectos de un desfase, traduzca los codones usando la Tabla 7.3.

TUTORÍA
Mutación del DNA

Mutaciones hacia atrás o reversiones

Las mutaciones puntuales son reversibles. Un *revertiente* se define operativamente como una cepa en la que se ha restaurado el fenotipo silvestre. Los revertientes pueden ser de dos tipos. En los *revertientes de un mismo sitio*, la mutación que restaura la actividad ocurre en el mismo sitio en el que ocurrió la mutación original. (Si la mutación hacia atrás no sólo es en el mismo sitio sino que, además, conduce a la secuencia silvestre, se denomina *verdadero revertiente*). En los *revertientes de segundo sitio*, la mutación ocurre en un sitio diferente en el DNA.

Las mutaciones en un segundo sitio pueden restaurar un fenotipo silvestre debido a varios tipos de **mutaciones supresoras** que restauran el fenotipo original. Las mutaciones supresoras son nuevas mutaciones que compensan el efecto de la mutación original. Se conocen varios tipos de mutaciones supresoras: (1) una mutación en otra parte del mismo gen puede restaurar la función génica, por ejemplo, una mutación por desfase del marco de lectura; (2) una mutación en otro gen puede restaurar la función del gen mutado original y la del fenotipo silvestre; y (3) una mutación en otro gen puede originar la producción de otra enzima capaz de reemplazar a la mutada usando una vía metabólica diferente a la usada por la enzima mutante. En este caso no existe producción de la enzima original, pero en los otros dos sí.

Mutaciones debidas a muchos pares de bases

Las **deleciones** son mutaciones en las que se ha eliminado una región del DNA. Tal como hemos discutido, las microdeleciones, la eliminación de uno o varios pares de bases (Figura 10.4), son a menudo mutaciones por desfase y pueden inactivar un gen. Sin embargo, las deleciones pueden también implicar la pérdida de varios cientos o miles de pares de bases. La deleción de un gran segmento de DNA ocasiona la pérdida total de la función de cualquier gen implicado. Algunas deleciones son tan grandes que afectan a varios genes (si alguno de los genes es esencial, la mutación será letal). Tales deleciones no pueden ser restauradas a través de otras mutaciones sino sólo mediante recombinación genética. De hecho, una de las maneras de distinguir las grandes deleciones de las mutaciones puntuales es que las segundas son revertidas por otras mutaciones, mientras que las segundas no.

Las **inserciones** ocurren cuando se añaden nuevas bases al DNA. Como ya hemos discutido, las inserciones, al igual que las deleciones, pueden implicar una sola base o muchas. Las microinserciones resultan de errores durante la replicación, como las deleciones, pero las inserciones grandes son el resultado de errores que ocurren durante la recombinación genética. Las inserciones inactivan el gen en el que ocurren. Muchas de estas mutaciones son debidas a inserciones de secuencias de DNA específicas identificables de DNA de 700-1400 pares de bases de longitud llamadas secuencias de inserción, un tipo de elemento transponible (*véase* Sección 7.4). La conducta de tales **secuencias de inserción** se discute en detalle en la Sección 10.11. Incluso las mutaciones debidas a inserciones grandes pueden revertir por mutación posterior, es decir, por una deleción que elimina la inserción.

Otros tipos de mutaciones a gran escala parecen implicar reordenamientos causados por errores en la recombinación. Éstos incluyen **translocaciones,** en las que largos fragmentos de DNA cromosómico se mueven a una localización diferente (y en eucariotas frecuentemente a un cromosoma diferente), y las **inversiones,** en las que la orientación de un segmento particular de DNA resulta invertida con respecto al DNA circundante.

Velocidades de mutación

Las frecuencias a las que ocurren los diferentes tipos de mutación varían ampliamente. Algunos tipos de mutaciones ocurren tan raramente que son casi imposibles de detectar, mientras que otras ocurren con tal frecuencia que a menudo plantean dificultades a los investigadores para mantener un cultivo genéticamente estable.

Los errores en la replicación del DNA ocurren a frecuencias de $10^{-7}-10^{-11}$ por cada par de bases durante cada ciclo de replicación. Un gen típico tiene unos 100 pares de bases. Por tanto, la frecuencia de estos errores de un gen sería de 10^{-4} a 10^{-8} por generación. Así, un cultivo normal de organismos totalmente crecido, con aproximadamente 108 células/ml, posee un buen número de mutantes diferentes por cada mililitro.

Sin embargo, no todas las mutaciones ocurren con la misma frecuencia. Los fenómenos de transposición ocurren más frecuentemente, aproximadamente a 10^{-4}. Por otra parte, la aparición de una mutación sin sentido es menos frecuente, $10^{-6}-10^{-8}$, porque sólo algunos codones pueden mutar a codones sin sentido. Existen también secuencias de DNA, que poseen generalmente cortas repeticiones, que son puntos calientes (*hot spots*) para mutaciones, dada la alta frecuencia de error de la DNA polimerasa en dichas secuencias.

A menos que el mutante sea seleccionable, la detección experimental de sucesos de tal rareza es difícil, y gran parte del ingenio del genético microbiano se aplica a incrementar la eficiencia de la detección de mutaciones. Como veremos en la siguiente sección, es posible incrementar significativamente la velocidad de mutación mediante tratamientos mutagénicos. Además, veremos que la frecuencia de mutación de un gen puede cambiar en ciertas situaciones.

Mutaciones en los genomas RNA

Mientras todas las células poseen DNA como material genético, algunos virus tienen genomas con RNA (para ejemplos, *véanse* Secciones 9.12, 16.1, 16.7, 16.9 y 16.14). Estos genomas también pueden mutar. Notablemente, la velocidad de mutación en los genomas RNA es unas *1000 veces mayor* que en genomas DNA. Al menos algunas RNA polimerasas tienen actividad *correctora* como las DNA polimerasas (*véase* Sección 7.6). Sin embargo, mientras existen varios sistemas de reparación del DNA que pueden corregir los cambios antes de que queden fijados como mutaciones (*véase* Sección 10.3), no existen mecanismos comparables de reparación de RNA. Esta elevada tasa de mutación en los virus RNA excede el interés académico. Los genomas RNA de virus que causan enfermedad pueden mutar rápidamente, originando una población en constante cambio y evolución.

✓ 10.2 Revisión de conceptos

Las mutaciones, espontáneas o inducidas, surgen por cambios en la secuencia del ácido nucleico del genoma de un organismo. Una mutación puntual, surgida por cambio en un solo par de bases, puede conducir a un cambio en un aminoácido de una proteína o a ningún cambio, dependiendo del codón particular implicado. En una mutación sin sentido, el codón se convierte en un codón de terminación y se produce una proteína incompleta. Las deleciones y las inserciones causan efectos más notables en el DNA, incluyendo mutaciones por desfase de lectura, y con frecuencia una pérdida completa de la función génica.

- ✓ ¿Qué significa decir que las mutaciones puntuales pueden revertir espontáneamente?
- ✓ ¿Ocurren mutaciones sin sentido en genes que codifican RNAs de transferencia (tRNAs)?

10.3 Mutagénesis

Mientras que la frecuencia de mutación espontánea es muy baja, hay una variedad de agentes químicos, físicos y biológicos que pueden incrementar la velocidad de mutación, y se dice que *inducen* a mutaciones. Estos agentes se conocen como **mutágenos.** Discutiremos algunos de sus principales tipos y sus modos de acción.

Mutágenos químicos

La Tabla 10.2 presenta una visión general de los principales mutágenos químicos y sus modos de acción. Existen varias clases de mutágenos químicos. Algunos son **análogos a las bases** ya que se parecen estructuralmente a las bases púricas y pirimídicas del DNA pero muestran propiedades erróneas de apareamiento (Figura 10.5). Cuando unos de estos análogos se incorpora al DNA, la replicación puede ocurrir normalmente, pero ocasionalmente ocurren errores de copia que ocasionan la incorporación de una base equivocada en la cadena copiada. La mutación se revela en la subsiguiente segregación de esta cadena.

Algunos mutágenos químicos reaccionan directamente con el DNA, causando cambios químicos en una u otra base, lo que ocasiona apareamientos erróneos u otros cambios (Tabla 10.2). Los *agentes alquilantes,* tales como, por ejemplo, la nitrosoguanidina, son poderosos mutágenos y generalmente inducen mutaciones con mayores frecuencias que los análogos a las bases. La acción de tales sustancias difiere de la de los análogos a las bases en que las sustancias que reaccionan con el DNA son capaces de introducir cambios directos, incluso en DNA que no se está replicando, mientras que los análogos a las bases actúan sólo tras su incorporación durante la replicación. Tanto los análogos a las bases como los agentes alquilantes tienden a inducir sustituciones de pares de bases (*véase* Sección 10.2).

Un grupo interesante de sustancias, las acridinas, son moléculas planas que actúan como *agentes intercalantes.* Estos mutágenos se insertan entre dos pares de bases del DNA, separándolas entre sí. Durante la replicación esta

TABLA 10.2 Mutágenos químicos y físicos y sus modos de acción

Agente	Acción	Resultado
Análogos de las bases		
5-Bromouracilo	Incorporado como T; falso apareamiento ocasional con G	Par AT → par GC; a veces GC → AT
2-Aminopurina	Incorporada como A; falso apareamiento con C	AT → GC; a veces GC → AT
Compuestos que reaccionan con DNA		
Ácido nitroso (HNO_2)	Desamina A y C	AT → GC y GC → AT
Hidroxilamina (NH_2OH)	Reacciona con C	GC → AT
Agentes alquilantes		
Monofuncional (por ejemplo, etilmetano sulfonato)	Introduce metilo en G; falso apareamiento con T	GC → AT
Bifuncional (por ejemplo, mostaza nitrogenada, mitomicina y nitrosoguanidina)	Entrecruzamiento de las cadenas de DNA, región cortada por DNasa	Mutaciones puntuales y deleciones
Corantes intercalantes		
Acridinas y bromuro de etidio	Inserción entre dos pares de bases	Microinserciones y microdeleciones
Radiación		
Ultravioleta	Formación de dímeros de pirimidina	La reparación puede originar error o deleción
Radiación ionizante (por ejemplo, rayos X)	Ataque de radicales libres al DNA, rotura de la cadena	La reparación puede originar error o deleción

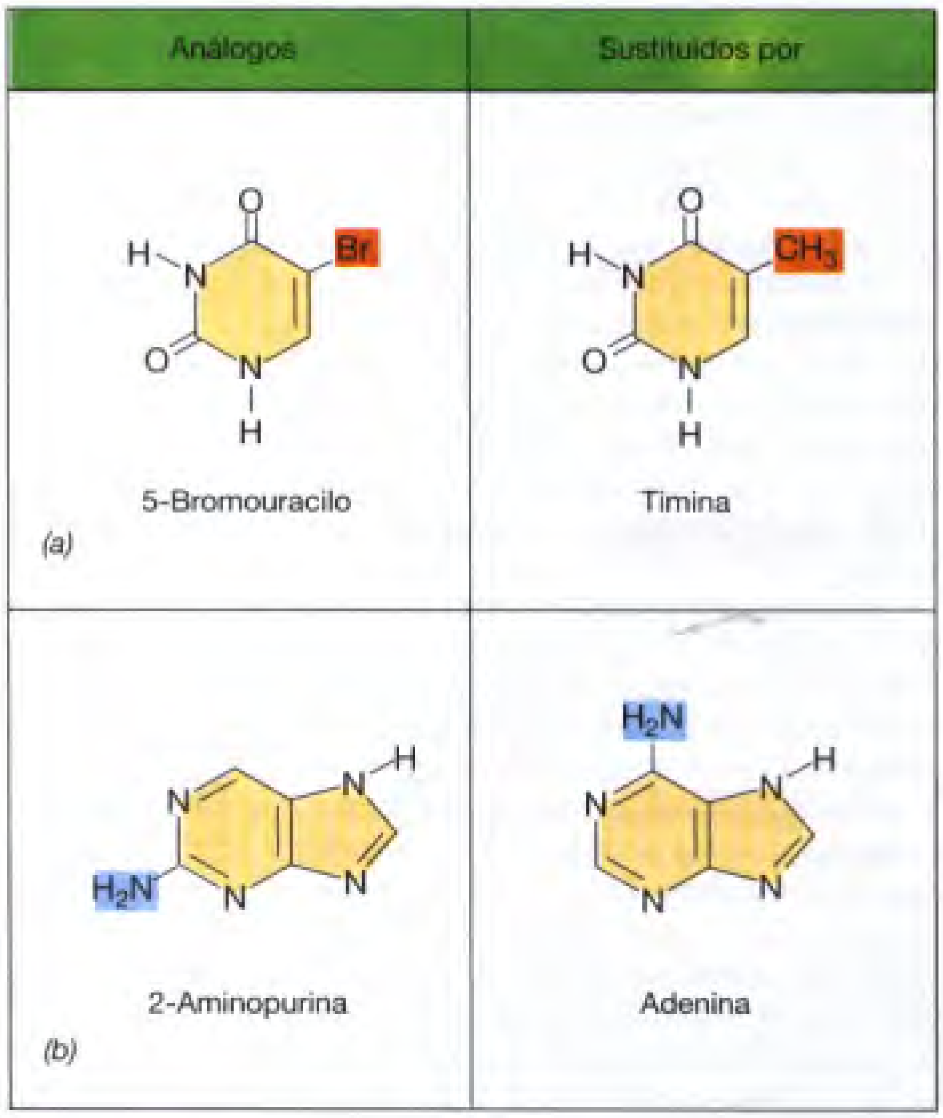


Figura 10.5 Estructura de dos análogos de bases corrientes para inducir mutaciones y bases normales a las que sustituyen en el ácido nucleico. El 5-Bromouracilo puede aparearse con la guanina causando sustituciones AT → GC. La 2-Aminopurina puede aparearse con la citosina causando sustituciones AT → GC.

conformación anormal puede conducir a microinserciones o microdeleciones en el DNA tratado con acridina. Por tanto, las acridinas pueden inducir mutaciones por desfase (*véase* Sección 10.2). El bromuro de etidio, utilizado frecuentemente para visualizar DNA en geles de electroforesis (*véase* Sección 10.2) es también un agente intercalante.

Radiación

Varias formas de radiación son altamente mutagénicas. Podemos dividir la radiación mutagénica en dos categorías principales, ionizantes y no ionizantes (electromagnéticas) (Figura 10.6). Aunque ambos tipos de radiación se usan en genética microbiana, las radiaciones *no ionizantes* se usan más y las comentaremos en primer lugar.

Las bases púricas y pirimídicas de los ácidos nucleicos absorben intensamente radiación ultravioleta (UV), y con un máximo de absorción para el DNA y el RNA es de 260 nm (*véase* Figura 7.9). Las proteínas también absorben radiación UV, pero tienen un máximo a 280 nm debido a la absorción de los aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina). Está bien establecido que la muerte de las células por radiación UV se debe principalmente a su acción sobre el DNA, de manera que la radiación de 260 nm es la más efectiva como agente letal. Aunque se conocen varios efectos, uno bien establecido es la inducción de **dímeros de pirimidina** en el DNA, un estado en el que dos bases pirimídicas adyacentes (citosina o timina) se unen covalentemente, de manera que se incrementa en gran medida la probabilidad de que durante la replicación del DNA, la DNA polimerasa inserte un nucleótido incorrecto en posición.

El tipo más frecuente de fuente de radiación UV que se usa en mutagénesis es la lámpara microbicida, la cual emi-

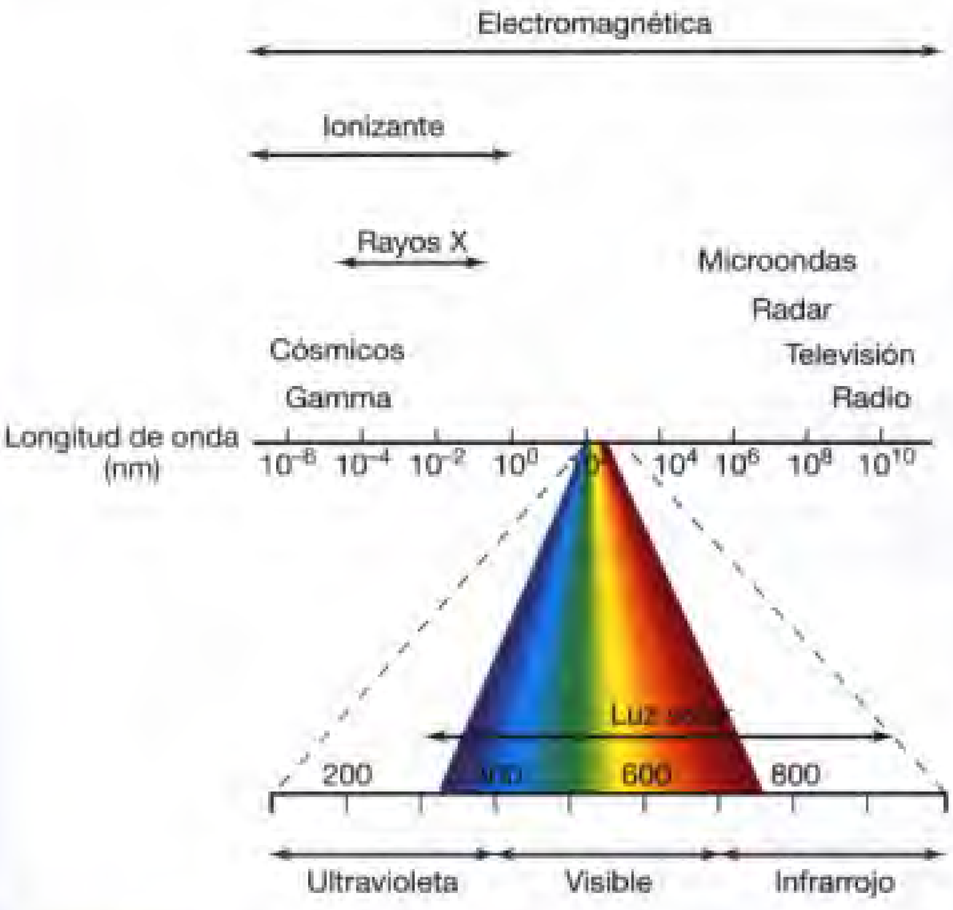


Figura 10.6 Longitudes de onda de la radiación.

te grandes dosis de radiación UV en la región de 260 nm. Suele utilizarse una dosis de radiación UV que produce un 90-95% de muerte en la población (*véase* Sección 20.2), y se buscan luego mutantes entre los supervivientes. Si se usan dosis mucho más altas de radiación, el número de células viables será demasiado bajo, mientras que si se usan dosis menores, se inducirán daños insuficientes en el DNA. La radiación UV es muy útil en el aislamiento de mutantes a partir de cultivos bacterianos.

Radiación ionizante

La radiación ionizante es una forma de radiación más potente e incluye rayos de longitud de onda corta, tal como rayos X, rayos cósmicos y rayos gamma (Figura (10.6). Estas radiaciones causan la ionización del agua y otras sustancias, y los efectos mutagénicos se producen indirectamente a causa de esta ionización. Entre las potentes especies químicas formadas por la radiación ionizante están los radicales libres, de los cuales el más importante es el radical hidroxilo OH ·. Los radicales libres reaccionan e inactivan macromoléculas celulares, siendo la más importante el DNA. Con toda probabilidad, el DNA no es más sensible que otras moléculas a la radiación ionizante, pero dado que el DNA es el material genético, los cambios inducidos en él tienen un efecto permanente. A bajas dosis de radiación ionizante, sólo ocurren unos pocos impactos en el DNA, pero a altas dosis ocurren impactos múltiples que conducen a la muerte de las células. Al contrario que la radiación UV, la radiación ionizante penetra fácilmente el vidrio y otros materiales. Por esta razón, la radiación ionizante se usa con frecuencia para inducir mutaciones en plantas y animales (donde su poder de penetración hace posible alcanzar con facilidad las células germinales de estos organismos), pero debido a que es más peligrosa de usar y está menos disponible, se emplea poco con microorganismos (donde la penetración de la radiación UV no es un problema).

Mutaciones que surgen de la reparación del DNA

Recordemos que la mutación es un cambio *heredable* en el material genético. Por tanto, si se corrige un error en la síntesis del DNA antes de que la célula se divida, no habrá mutación. Además, algunos daños en el DNA no pueden ser replicados y, por tanto, no pueden convertirse en una mutación. Por ejemplo, si una molécula de DNA contiene dímeros de pirimidina, *no* se replicará para dar dos moléculas con dímeros de pirimidina cada una. Si tal daño no puede ser reparado, las células probablemente morirán. La mayoría de las células tienen una variedad de sistemas de reparación de DNA para corregir errores o reparar daños. Muchos de estos procesos de reparación no cometen errores. Sin embargo, algunos procesos parecen ser *propensos a error*, y el mismo mecanismo de reparación origina la mutación. Muchos tipos de mutaciones surgen como resultado de reparaciones defectuosas de los daños originados en el DNA por algunos de los agentes antes comentados.

A menudo, el mismo daño en el DNA puede *inducir* sistemas de reparación del DNA. Un mecanismo celular complejo, llamado **sistema regulador SOS**, se activa como consecuencia de daños en el DNA y pone en marcha un cierto número de procesos de reparación del DNA. Sin embargo, en el sistema SOS, algunas reparaciones ocurren en ausencia de las instrucciones del molde, es decir, sin apareamiento de bases, lo que ocasiona la creación de muchos errores y, por tanto, de muchas mutaciones.

En el sistema regulador SOS, el daño al DNA actúa como una señal de estrés para la célula, originando la desrepresión coordinada (inducción) de varias funciones celulares implicadas en la reparación del DNA (Figura 10.7). Puesto que uno de los mecanismos de reparación del DNA del sistema SOS es inherentemente propenso a error, el daño al DNA por diversos agentes, tales como compuestos químicos y radiación, conduce a mutagénesis. Gran parte de estas mutaciones son ocasionadas por la DNA polimerasa V, codificada por los genes *umu*C y *umu*D (*véase* figura 10.7). La DNA polimerasa IV propensa a error también se induce como parte de la respuesta SOS. Estas enzimas se conocen a veces como **DNA mutasas**.

Una vez que el DNA dañado ha sido reparado, el sistema SOS se desconecta y cesa la mutagénesis.Además de su efecto sobre la mutagénesis celular, el sistema regulador SOS juega un papel central en la regulación de la replicación de los virus temperados (*véase* Sección 9.10).

Debe resaltarse que no toda la reparación del DNA ocurre en ausencia de las instrucciones del DNA molde. En general, las células tienen muchos sistemas de reparación que requieren las instrucciones del molde y llevan a cabo una reparación correcta. Parece que estos sistemas funcionan la mayor parte del tiempo pero que no son suficientes para reparar la gran cantidad de daño provocada por algunos de los agentes mencionados anteriormente.

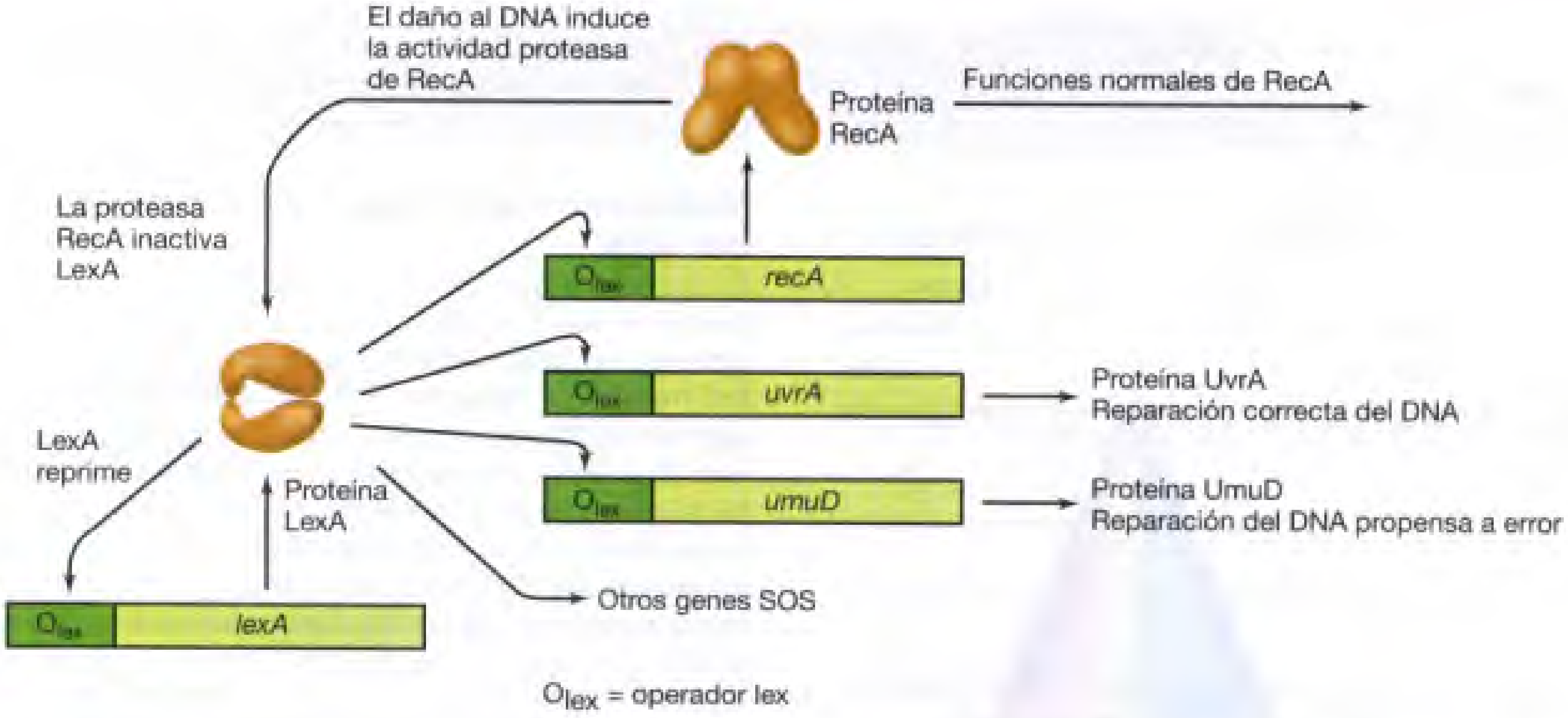

El daño al DNA induce la actividad proteasa de RecA
Proteína RecA
Funciones normales de RecA
La proteasa RecA inactiva LexA
Olex
recA
Olex
uvrA
Proteína UvrA
Reparación correcta del DNA
LexA reprime
Proteína LexA
Olex
umuD
Proteína UmuD
Reparación del DNA propensa a error
Olex
lexA
Otros genes SOS
Olex = operador lex

Figura 10.7 Mecanismo de la respuesta SOS. El daño al DNA ocasiona la conversión de la proteína RecA en una proteína que rompe la proteína LexA. La proteína LexA normalmente reprime las actividades del gen *recA* y de los genes de reparación del DNA *uvrA* y *umuD*. (La proteína UmuD es parte de la DNA polimerasa V.) Nótese que, no obstante, la represión no es completa. Se produce alguna proteína RecA incluso en presencia de la proteína LexA. Con LexA inactivada, estos genes se activan. Como proteasa, la proteína RecA también corta la proteína que actúa como represor de lambda (*véase* Sección 9.10).

Cambios en la velocidad de mutación

La frecuencia de mutación de un organismo es un fenotipo bajo presión de selección como cualquier otro. El hecho de que las *Archaea* hipertermofílicas (*véase* Capítulo 13) tengan aproximadamente la misma velocidad de mutación que las cepas de laboratorio de *Escherichia coli*, podía hacer imaginar que esta presión ha conducido a la selección de organismos con las velocidades de mutación más bajas posibles. Sin embargo, esto no es así. Se conocen mutantes de algunos organismos que son hiperprecisos. En estos organismos, sin embargo, los mecanismos correctores o de reparación pueden tener un coste metabólico tan alto que sitúen al organismo en una clara desventaja. Por supuesto, ciertos organismos pueden beneficiarse de tales mecanismos para ocupar ciertos nichos ambientales. Un buen ejemplo es la bacteria *Deinococcus radiodurans* (*véase* Sección 12.34), que es 20 veces más resistente a la radiación ultravioleta y 200 veces más resistente a la radiación ionizante que *E. coli*. Esta resistencia, dependiente en parte de sistemas redundantes de reparación de DNA y de mecanismos para exportar nucleótidos dañados, permite al organismo sobrevivir en ambientes en donde otros organismos no pueden. Quizá, lo más interesante sea el hecho de que lo contrario también puede ocurrir; esto es, algunos organismos pueden beneficiarse de su *elevada* tasa de mutación.

Los sistemas de reparación del DNA están, a su vez, codificados por genes y, por tanto, sujetos a mutación. Por ejemplo, la subunidad de la DNA polimerasa III implicada en procesos correctores (*véase* Sección 7.6) está codificada por el gen *dnaQ*. Ciertas mutaciones en este gen originan células que son aún viables pero poseen una mayor frecuencia de mutación. Una cepa con una frecuencia de mutación incrementada se dice que es hipermutable o un **mutador**. Se conocen mutaciones en varios sistemas de reparación de DNA que pueden originar un fenotipo mutador. El fenotipo mutador es aparentemente seleccionado en ambientes complejos y cambiantes, puesto que las cepas con fenotipos mutadores son más frecuentes en estas condiciones. Presumiblemente, en un ambiente tal, cualquier desventaja proveniente de una mayor frecuencia de mutación es contrabalanceada por la capacidad para generar nuevas y útiles mutaciones. (Nótese que cuando las condiciones ambientales se estabilizan o regresan a la «normalidad», la ventaja de la cepa mutadora se perderá.)

Como hemos indicado antes, puede inducirse un fenotipo mutador en cepas silvestres por situaciones de estrés, no por mutaciones en los genes implicados en la reparación del DNA, sino por la regulación normal de la función de estos genes. Por ejemplo, la respuesta SOS induce reparación propensa a error. Por tanto, cuando se activa la respuesta SOS, se incrementa la velocidad de mutación. Mientras en algunos casos esto puede ser un subproducto necesario de la reparación del DNA, en otros casos la incrementada frecuencia de mutación puede representar un valor en sí misma. Esto es, el organismo puede generar *mutaciones adaptativas*. La **mutación adaptativa** origina un fenotipo en el mutante que le permite sobrevivir al estrés particular.

Mutagénesis biológica y dirigida

Se pueden generar mutaciones sin el uso de agentes químicos o físicos mediante el proceso de *mutagénesis por transposón*. Discutiremos los detalles de la mutagénesis por transposón más adelante en este capítulo (*véase* Sección 10.11) y aquí sólo indicaremos que si la inserción de un elemento transponible ocurre *dentro* de un gen, por lo general se pierde la función del gen (*véase* Figura 10.1*c*). Dado que los elementos transponibles pueden insertarse en varias localizaciones del cromosoma, los transposones se usan con profusión por los genéticos microbianos como agentes mutagénicos.

Hasta ahora, hemos considerado mutaciones que ocurren al azar en el genoma de la célula microbiana. La tecnología del DNA recombinante y el uso del DNA sintético hacen posible inducir mutaciones *específicas* en genes *específicos*. Los procedimientos para llevar a cabo mutagénesis en sitios específicos del genoma se llaman *mutagénesis dirigida* y se tratarán en detalle al final de este capítulo (*véase* Sección 10.18).

✓ 10.3 Revisión de conceptos

Los mutágenos son agentes químicos, físicos o biológicos que incrementan la frecuencia de mutación. Los mutágenos pueden alterar el DNA de muchas y diversas maneras. Sin embargo, las alteraciones en el DNA no son mutaciones a menos que sean heredadas. Algunos daños en el DNA conducen a la muerte celular si no se reparan.

- ✓ ¿Cómo funcionan los mutágenos?
- ✓ Diferencie entre mutación y daño al DNA.

10.4 Mutagénesis y carcinogénesis: el test de Ames

Se ha desarrollado el uso práctico de cepas bacterianas para identificar sustancias potencialmente peligrosas en el medio ambiente. Dado que la sensibilidad a la que se pueden detectar mutantes seleccionables en grandes poblaciones de bacterias es muy alta, las bacterias pueden utilizarse como agentes analíticos para detectar la mutagenicidad potencial de sustancias químicas. Esto es importante, porque se ha observado que muchos mutágenos químicos son también carcinogénicos, es decir, capaces de causar cáncer en animales o en el hombre.

La variedad de sustancias, tanto naturales como artificiales, con la que la población humana entra en contacto mediante exposición agrícola o industrial es enorme. Se necesitan pruebas simples para determinar la seguridad de tales productos. Existe evidencia de que una gran proporción de los cánceres humanos tienen una causa medioambiental, muy probablemente mediante agentes químicos, lo que hace urgente la detección de estos carcinógenos químicos. El que un compuesto sea mutagénico no implica necesariamente que sea carcinogénico. Sin embargo, la correlación es muy alta, y la determinación de que una sustancia sea mutagénica en un sistema bacteriano sirve como aviso de un peligro potencial. De igual manera, el hecho de que un compuesto no sea mutagénico en un sistema bacteriano no significa que no sea carcinogénico, ya que el sistema bacteriano no puede detectar todos los compuestos que son activos en animales superiores. El desarrollo de pruebas bacterianas para el rastreo de carcinógenos fue puesto a punto inicialmente en la Universidad de Berkeley bajo la dirección de Bruce Ames, y el ensayo de mutagenicidad se llama frecuentemente **test de Ames** (Figura 10.8).

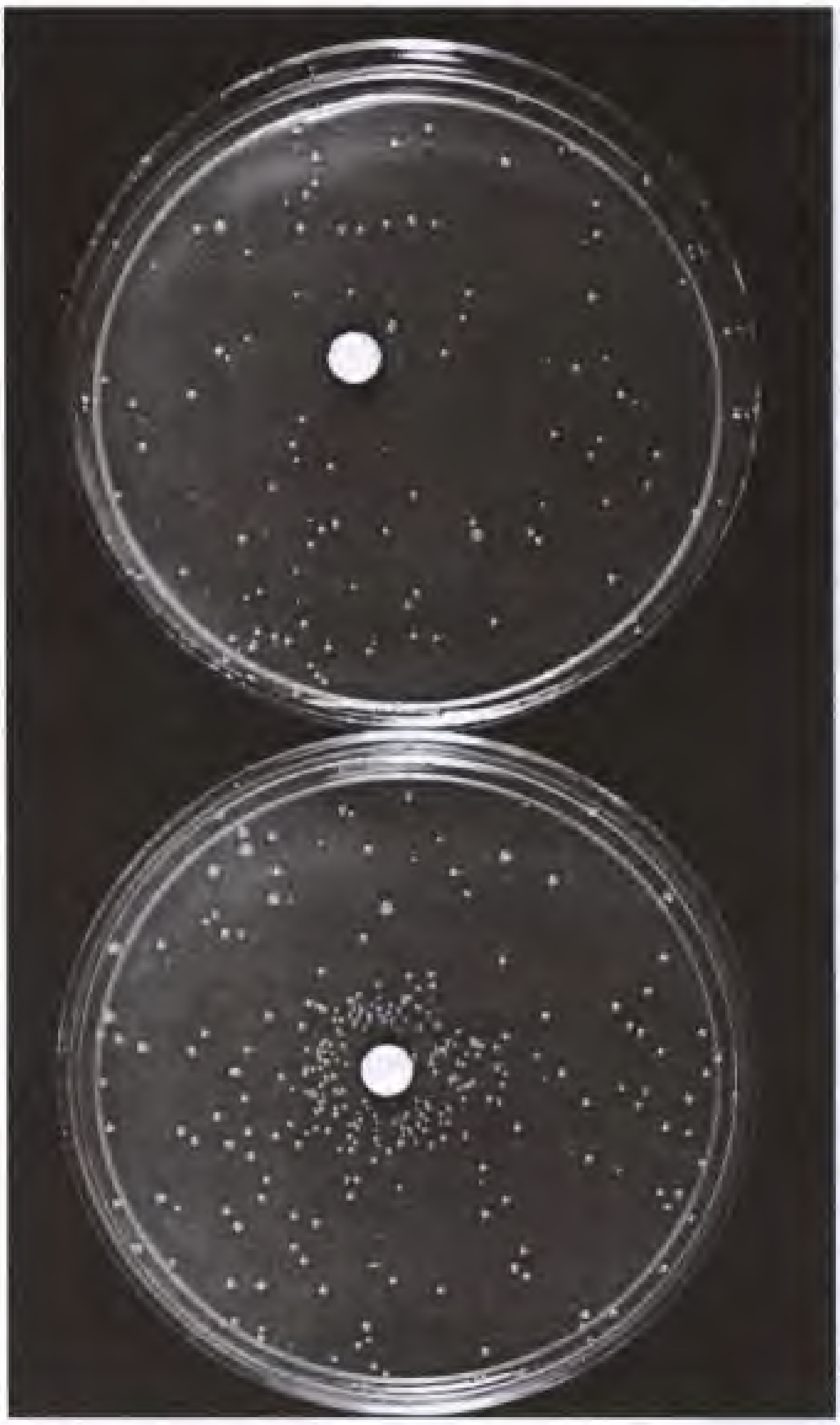

T. D. Brock

Figura 10.8 El test de Ames se usa para evaluar la mutagenicidad de un compuesto. Ambas placas se inocularon con un cultivo de un mutante de *Salmonella enterica* que requiere histidina. El medio no contiene histidina, de modo que sólo podrán crecer las células que reviertan al tipo silvestre. En ambas placas aparecen revertientes espontáneos, pero el compuesto en el disco de papel de filtro de la placa de ensayo (abajo) ha aumentado la frecuencia de mutación, como puede verse por el mayor número de colonias que rodea al disco. No se ven revertientes muy próximos al disco porque la concentración de mutágeno en esa zona es tan alta que resulta letal.

Protocolo del test de Ames

El método usual para probar compuestos químicos en mutagénesis ha sido determinar si el mutágeno sospechoso aumenta la frecuencia de mutaciones hacia *atrás* (reversiones) en cepas bacterianas que son auxotrofas para algún nutriente. Es importante que la mutación original sea una mutación puntual, de modo que pueda ocurrir la reversión. Cuando células de dicha cepa auxotrófica se extienden en un medio que carece del nutriente requerido (por ejemplo, un aminoácido), no ocurrirá crecimiento, e incluso no aparecerán colonias visibles cuando se extiendan sobre la placa grandes poblaciones de células. Sin embargo, si han surgido mutantes revertientes, tales células serán capaces de formar colonias. Por tanto, si se siembran 10^8 células en la superficie de una placa, pueden detectarse incluso 10-20 revertientes, debido a las 10-20 colonias que pueden formar. Si la frecuencia de reversión se ha incrementado por el mutágeno químico, el número de colonias también incrementará. Las cepas más usadas en el test de Ames han sido auxotrofos de histidina de *Samonella enterica* (Figura 10.8) y auxotrofos de triptófano de *Escherichia coli*.

Aunque el simple ensayo de mutagénesis en bacterias se ha realizado durante mucho tiempo, el test de Ames ha introducido dos elementos que lo han hecho mucho más poderoso. El primero es el uso de cepas bacterianas que usan casi exclusivamente vías de reparación del DNA propensas a error (*véase* Sección 10.3). El segundo elemento importante es el uso de preparaciones enzimáticas de hígado para convertir las sustancias químicas en sus formas activas mutagénicas (y carcinogénicas). Se ha determinado que muchos carcinógenos potentes no son directamente carcinogénicos o mutagénicos sino que sufren cambios químicos en el cuerpo humano que los convierten en sustancias activas. Estos cambios ocurren fundamentalmente en el hígado, donde enzimas implicadas en detoxificación (oxidasas de función mixta) provocan la formación de epóxidos y otras formas activadas de los compuestos, que son entonces altamente reactivas con el DNA.

En el test de Ames se usa primero una preparación de hígado de rata para activar el compuesto. Luego, el complejo activado se coloca en un papel de filtro y se sitúa en el centro de una placa en la que se ha sembrado una cepa bacteriana apropiada. Tras una noche de incubación, la mutagenicidad del compuesto puede determinarse observando un halo de revertientes en el área que circunda el disco de papel (Figura 10.8). Es necesario realizar siempre el ensayo con varias concentraciones del compuesto y con controles positivos y negativos apropiados, ya que los compuestos varían en su actividad mutagénica y son letales a niveles elevados. Un gran número de compuestos químicos se han sometido al test de Ames, que se ha convertido en uno de los análisis preliminares más útiles para determinar el potencial carcinogénico de un compuesto.

✓ 10.4 Revisión de conceptos

El test de Ames emplea un sistema de ensayo bacteriano sensible para determinar mutágenos químicos en el ambiente.

- ✓ ¿Por qué el test de Ames mide la frecuencia de mutación *reversa* hacia atrás más que la velocidad de mutación *directa*?
- ✓ ¿Cuál es la importancia de la detección de mutágenos en relación con la prevención del cáncer?

10.5 Recombinación genética

La recombinación genética implica el intercambio físico de material genético entre elementos genéticos. En esta Sección, nos centraremos en la **recombinación general** u **homóloga**, que comprende un intercambio genético entre secuencias *homólogas* de DNA de dos orígenes diferentes (aunque tal recombinación puede ocurrir entre secuencias homólogas en el mismo cromosoma). Las secuencias homólogas de DNA tienen la misma, o casi la misma, secuencia; por tanto, el apareamiento de las bases puede ocurrir a lo largo de una longitud considerable de las dos moléculas de DNA. Este tipo de recombinación está implicada en el proceso conocido como «entrecruzamiento» (*crossing over*) en la genética clásica.

La recombinación homóloga es extremadamente importante en todos los organismos. Sin embargo, es también muy compleja. Incluso en la bacteria *Escherichia coli* hay al menos 25 genes implicados. Además, la recombinación homóloga es de tanta importancia que existen varias rutas redundantes. Por tanto, si una ruta se inhibe o no es funcional, otra puede ser capaz de suplir las funciones necesarias.

Etapas moleculares en la recombinación homóloga

A nivel molecular, la recombinación ha sido estudiada principalmente en procariotas y virus. En *Bacteria*, la recombinación general conlleva la participación de una proteína específica llamada RecA, codificada por el gen *recA*. La proteína RecA es esencial en casi todos los procesos de recombinación homóloga. Se han identificado proteínas similares a RecA en todos los procariotas examinados, incluyendo las *Archaea*, así como en levaduras y *Eukarya* superiores.

La Figura 10.9 muestra una visión global del mecanismo molecular general de la recombinación general. El proceso comienza con una *mella* (generada generalmente por una nucleasa) en una de las moléculas de DNA. Esta cadena rota debe ser desplazada de la otra cadena por proteínas con actividad helicasa (*véase* Sección 7.6). En algunas vías, enzimas especializadas, tales como la enzima RecBCD de *E. coli*, tienen tanto actividad nucleasa como helicasa. Una proteína de unión a cadena sencilla (*véase* Sección 7.6) se une luego al segmento monocatenario resultante. A continuación, la proteína RecA se une al fragmento monocatenario, formando un complejo que facilita el anillamiento con una secuencia complementaria en el dúplex adyacente, con desplazamiento simultáneo de la banda residente (Figura 10.9). Este proceso se conoce frecuentemente como *invasión de banda*. Como se indicó, la recombinación implica el *apareamiento* de moléculas de DNA a lo largo de grandes fragmentos. Tras el apareamiento, puede ocurrir un *intercambio* de secuencias de DNA homólogas, lo que conduce a la formación de intermediarios de recombinación que contienen extensas regiones de **heterodúplex,** en las que cada cadena proviene de un cromosoma diferente. Este proceso también implica DNA polimerasa y ligasa. Estas regiones pueden ser extendidas por la proteína RecA. Finalmente, las moléculas ligadas se *resuelven* en dos moléculas recombinantes por la acción de nucleasas y DNA ligasa.

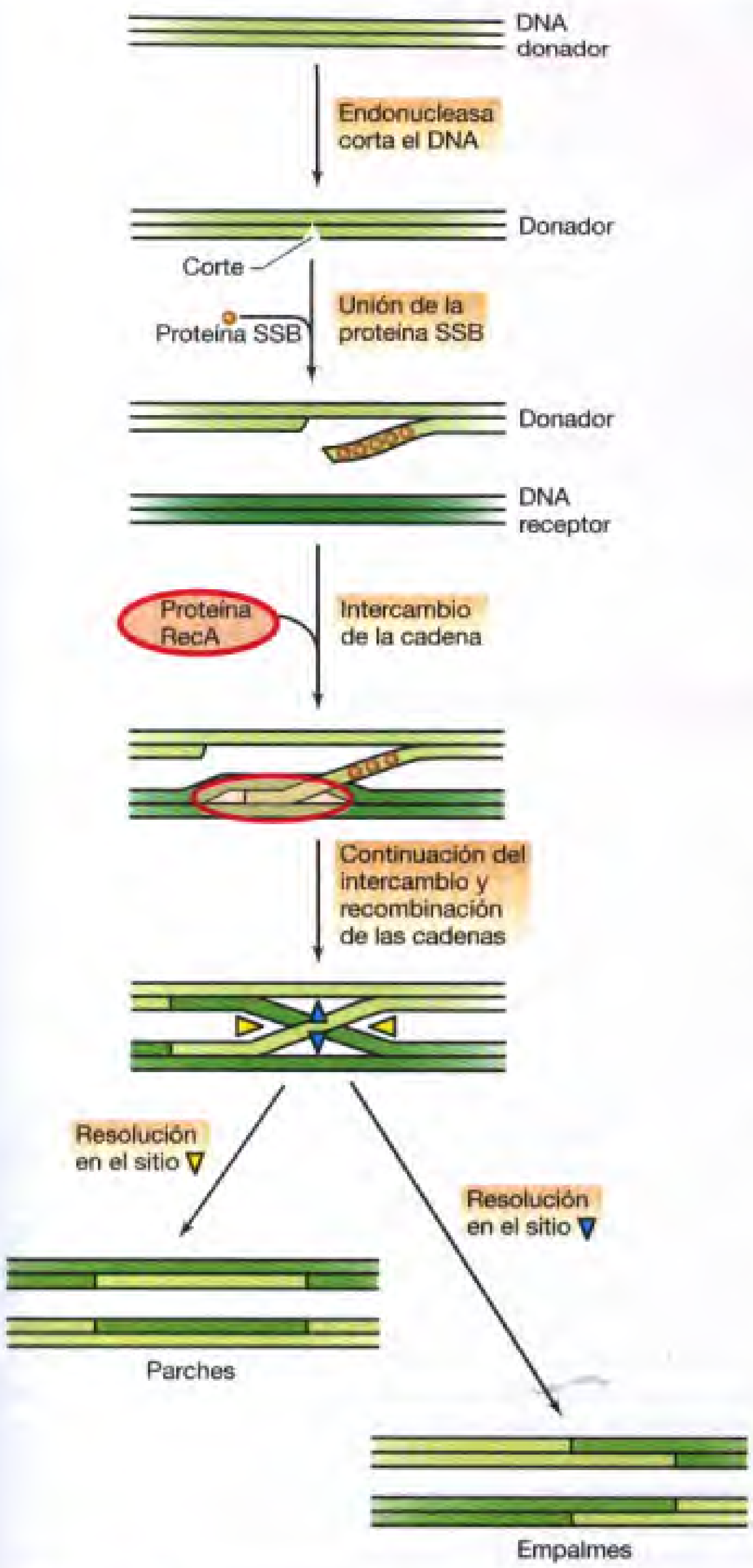


Figura 10.9 Versión simplificada de un mecanismo molecular de recombinación genética. Moléculas homólogas de DNA se emparejan e intercambias segmentos de DNA. El mecanismo implica rotura y unión de segmentos apareados. Se indican dos de las proteínas implicadas, una proteína de unión a cadenas sencillas (SSB) y la proteína RecA. El diagrama no está a escala: el apareamiento puede ocurrir a lo largo de cientos o miles de pares de bases. Nótese que existen dos posibles soluciones, dependiendo de las cadenas que sean cortadas durante el proceso de resolución. En un caso, las moléculas recombinantes tienen parches, mientras que en el otro las dos cadenas parentales parecen haber sido cortadas y empalmadas la una con la otra.

Este mecanismo de formación de estructuras recombinantes de DNA es completamente natural y ocurre frecuentemente en la célula. El que conduzca o no a la formación de nuevos genotipos depende de si las dos moléculas que sufren recombinación difieren genéticamente en regiones que están fuera de la región de recombinación. Se acepta que, dentro de ciertos límites, la recombinación general se produce al azar a lo largo de todo el genoma. Por tanto, la probabilidad de que ocurra recombinación entre dos genes es proporcional a la distancia. Este hecho resulta útil en el mapeo genético. Por análisis de recombinación es posible mapear la posición de los genes en los cromosomas, ya que cuanto *más alejados* estén dos genes, más probable es que sufran recombinación.

Para que surjan nuevos genotipos como resultado de la recombinación general, es esencial que las dos secuencias homólogas sean genéticamente distintas. Tal es el caso de una célula eucariótica diploide (*véase* Sección 14.6), que posee dos juegos de cromosomas, uno procedente de cada padre. Las dos moléculas diferentes se juntan como resultado de la reproducción sexual, un proceso que forma parte del ciclo de vida regular de la mayor parte de los organismos eucarióticos. En los procariotas, existen diversos mecanismos implicados en reunir moléculas de DNA genéticamente distintas pero homólogas, pero el proceso de recombinación no es menos importante. La recombinación puede ser crítica también en el ciclo de vida de algunos virus. En los Capítulos 9 y 16, vimos que algunos bacteriófagos como T4 y T7 (*véanse* Secciones 9.9 y 16.4) requieren recombinación homóloga como un paso durante la replicación del DNA.

En procariotas, la recombinación genética puede observarse porque los *fragmentos* de DNA homólogo de un cromosoma donador son transferidos a una célula receptora por uno de estos procesos: *transformación* (*véase* Sección 10.6), *transducción* (*véase* Sección 10.7) y *conjugación* (*véase* Sección 10.9). La recombinación homóloga sólo puede ocurrir tras la transferencia, es decir, cuando el fragmento de DNA del donador está en la célula receptora. Como sólo se transfiere un fragmento del cromosoma, si no se produce recombinación el fragmento se perderá, puesto que no puede replicarse independientemente. Es importante, pues, recordar, que la transferencia es sólo el primer paso en procariotas para obtener organismos recombinantes.

Detección de la recombinación

Para detectar el intercambio físico de segmentos de DNA, las células producto de la recombinación deben ser fenotípicamente diferentes de los padres. En cruces entre microorganismos, deben usarse como cepas receptoras aquellas que carezcan de alguna de las características seleccionables que vayan a poseer los recombinantes. Por ejemplo, la cepa receptora deberá ser incapaz de crecer en un medio particular, mientras que los recombinantes genéticos a seleccionar sí pueden hacerlo. En la Sección 10.1, mencionamos varios tipos de marcadores seleccionables y no seleccionables (tales como resistencia a drogas, requerimientos nutricionales y otros). La enorme sensibilidad del proceso de selección viene indicada por el hecho de que en cada placa se pueden sembrar 10^8 bacterias o más sin que aparezcan colonias parentales, mientras que algunos recombinantes formarán colonias si se utilizan las condiciones selectivas apropiadas (Figura 10.10). El único requerimiento es que la frecuencia de mutación *reversa* para la característica seleccionada sea baja, puesto que los revertientes también formarán colonias. Este problema se puede superar a veces usando mutantes dobles, porque es muy improbable que ocurran dos mutaciones reversas en la misma célula. Gran parte del ingenio de un genético microbiano se manifiesta en la elección de los mutantes y medios selectivos apropiados para la detección eficaz de la recombinación genética. Debido a que la selección es muy eficiente y dado que pueden realizarse cruces con miles de millones de células individuales, el análisis de la recombinación es una herramienta muy importante en genética microbiana.

✓ 10.5 *Revisión de conceptos*

La recombinación homóloga ocurre cuando secuencias estrechamente relacionadas de dos elementos genéticos distintos se combinan juntas en el mismo elemento. La recombinación es un importante proceso evolutivo, y las células tienen mecanismos específicos para asegurar que ocurre recombinación. Los mecanismos de recombinación que tienen lugar en procariotas implican transferencia de DNA durante los procesos de transformación, transducción y conjugación.

- ✓ ¿Qué proteína, que se encuentra en todos los procariotas, facilita el apareamiento requerido por la recombinación homóloga?
- ✓ En eucariotas, la recombinación implica cromosomas enteros, pero no ocurre lo mismo en procariotas. Explíquelo.

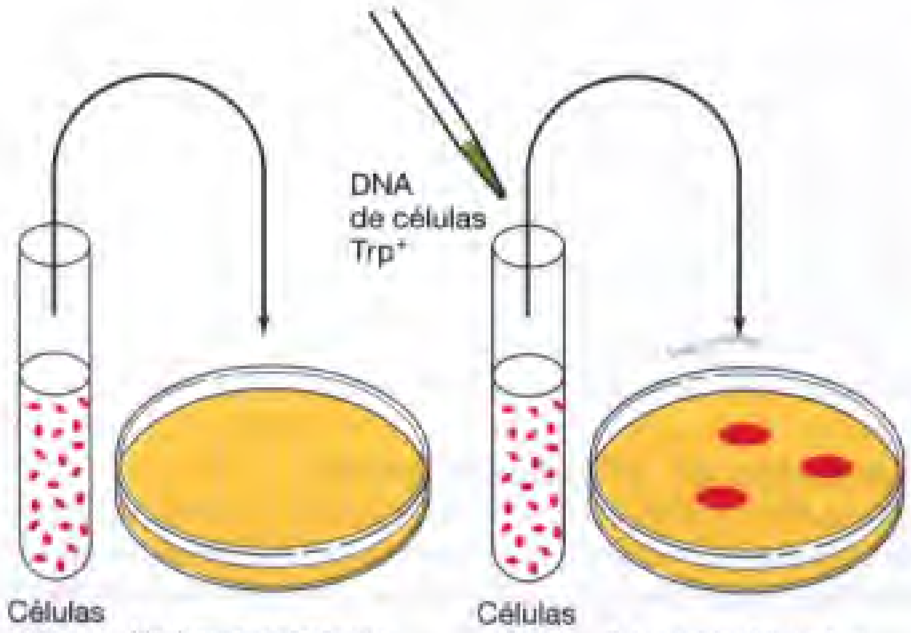

DNA de células Trp⁺
Células Trp⁻
No hay crecimiento en medio sin triptófano
Células Trp⁻
Los recombinantes forman colonias en medio sin triptófano

Figura 10.10 Uso de medio selectivo para detectar recombinantes genéticos poco frecuentes entre una gran población de no recombinantes. En el medio selectivo sólo forman colonias los recombinantes raros. Normalmente, procedimientos como éste, que ofrecen un análisis genético de alta resolución, sólo se pueden utilizar con microorganismos. El tipo de intercambio genético ilustrado es la transformación, que se comenta en la Sección 10.6.

II TÉCNICAS DE GENÉTICA BACTERIANA: *IN VIVO*

Para «hacer genética» el genético debe cruzar cepas de un organismo que tienen diferentes genotipos (y fenotipos) y buscar recombinantes. Durante gran parte de los últimos 50 años, los genéticos bacterianos que deseaban realizar estos cruces dependían de los procesos naturales por los que las bacterias intercambian material genético. Estos tres procesos *in vivo* son: (1) **transformación,** que implica DNA donador en estado libre en el ambiente (*véase* Sección 10.6), (2) **transducción,** en el que la transferencia del DNA donador está mediada por un virus (*véase* Sección 10.8), y (3) **conjugación,** donde la transferencia implica un contacto célula-célula y la presencia de un *plásmido conjugativo* en la célula donadora (*véase* Sección 10.9). Estos procesos se comparan en la Figura 10.11 y se discutirán en detalle en las siguientes secciones.

10.6 Transformación genética

Como ya hemos notado, la transformación genética es un proceso por el que el DNA libre se incorpora en una célula receptora y lleva a cabo un cambio genético. El descubrimiento de la transformación genética en bacterias fue uno de los acontecimientos más destacables en biología, ya que condujo a experimentos que demostraron que el DNA es el material genético (*véase* recuadro, «Orígenes de la genética bacteriana»). Este descubrimiento se convirtió en la piedra angular de la biología molecular y la biología moderna.

Se han encontrado varios procariotas que son transformables en condiciones naturales, incluyendo ciertas especies de *Bacteria*, tanto Gram positivas como Gram negativas, y algunas especies de *Archaea*. Sin embargo, incluso dentro de los géneros transformables, sólo ciertas cepas o especies resultan transformables. Puesto que el DNA de los procariotas está presente en la célula como una gran molécula única, cuando la célula se lisa en condiciones suaves, el DNA sale y se extiende (Figura 10.12). A causa de su gran longitud (1700 µm en *Bacillus subtilis*), la molécula de DNA se rompe fácilmente; incluso tras extracción suave el cromosoma de 4,2 megapares de bases de *B. subtilis* se fragmenta en porciones de 15 kilopares de bases. Como el gen medio tiene un tamaño de 1000 nucleótidos, cada uno de los fragmentos de DNA purificado tiene unos 15 genes. Normalmente una célula incorpora sólo uno o unos cuantos fragmentos de DNA, de modo que en un único suceso de transformación sólo se puede transferir de una célula a otra una pequeña cantidad de genes.

Competencia

Una célula que es capaz de tomar una molécula de DNA y ser transformada se dice que es **competente.** Sólo ciertas cepas son competentes; esta capacidad parece ser una propiedad determinada genéticamente. En la mayoría de las bacterias que se pueden transformar naturalmente, la competencia está regulada y hay proteínas especiales que juegan un papel en el transporte y procesamiento del DNA.

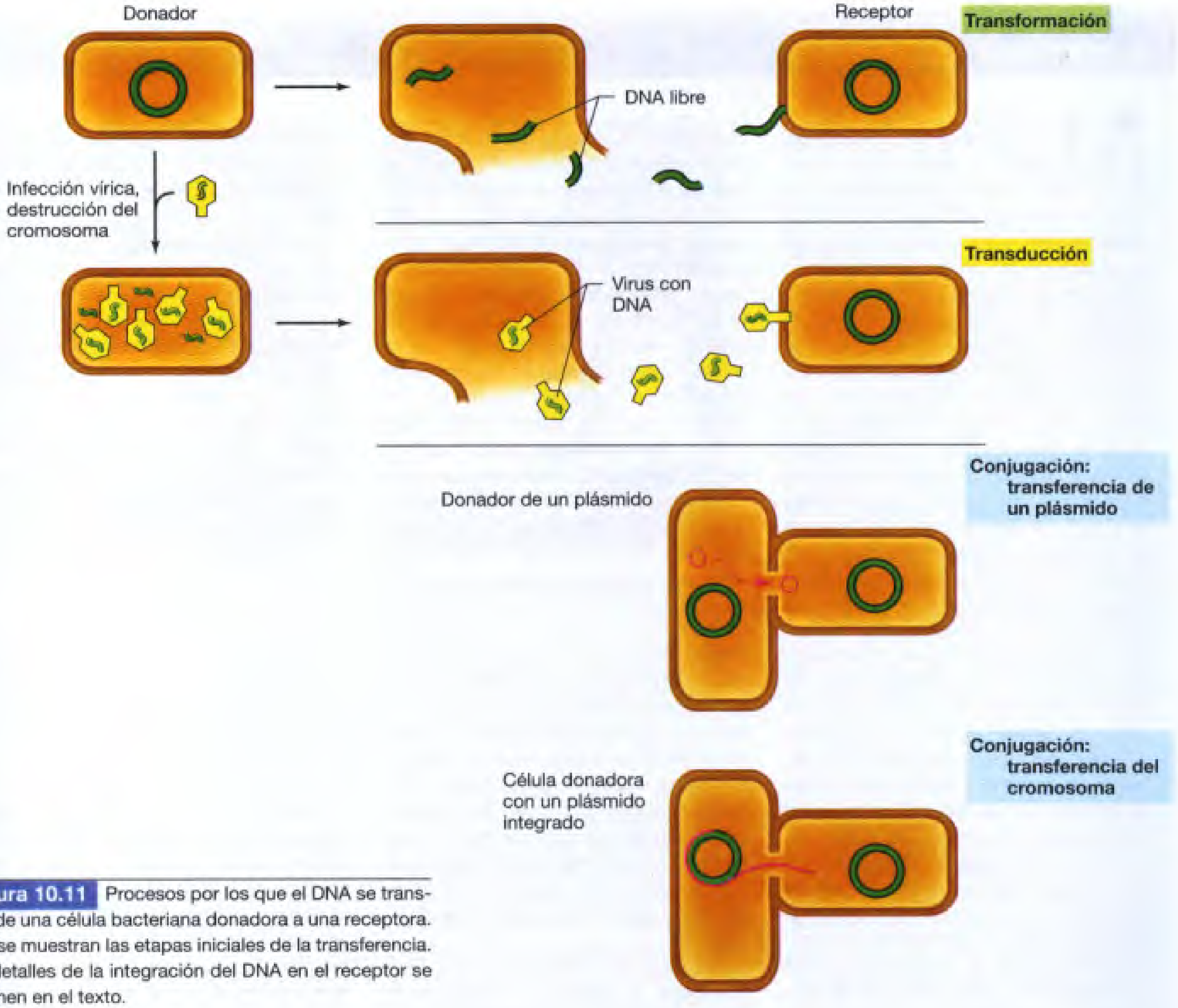

Donador
Receptor
Transformación
DNA libre
Infección vírica, destrucción del cromosoma
Transducción
Virus con DNA
Conjugación: transferencia de un plásmido
Donador de un plásmido
Conjugación: transferencia del cromosoma
Célula donadora con un plásmido integrado

Figura 10.11 Procesos por los que el DNA se transfiere de una célula bacteriana donadora a una receptora. Sólo se muestran las etapas iniciales de la transferencia. Los detalles de la integración del DNA en el receptor se exponen en el texto.

Las proteínas específicas de la competencia incluyen una proteína de membrana de unión del DNA, una autolisina de la pared celular, y varias nucleasas. Una vía implicada en la competencia natural de *Bacillus subtilis* es parte de un sistema de *quorum sensing* (un sistema regulador que responde al número de células, *véase* Sección 8.9) regulada por un sistema de dos componentes (*véase* Sección 8.10). Las células producen y excretan un pequeño péptido durante el crecimiento y llegan a ser competentes a altas concentraciones de este péptido, a través de la acción de ComP, una quinasa sensora, y ComA, un regulador de respuesta. ComA es una proteína activadora (*véase* Sección 8.6) que regula un número de genes que afectan a la transformación. En *Bacillus*, aproximadamente el 20% de las células se hacen competentes y permanecen así durante varias horas. Sin embargo, en *Streptococcus*, el 100% de las células se hacen competentes, pero sólo durante unos minutos a lo largo del ciclo de crecimiento.

Incorporación de DNA

Las bacterias difieren en la forma en que incorporan el DNA aunque en todos los casos sólo entra en el citoplasma DNA monocatenario. Por ejemplo, en *Haemophilus*, que es Gram negativo, la célula sólo toma DNA bicatenario, a pesar de que sólo se incorporan en el genoma mediante recombinación segmentos monocatenarios. En *Bacteria* Gram negativas, parece que el DNA bicatenario es degradado a cadena sencilla en el espacio periplásmico (*véase* Sección 4.9) y sólo penetra en el citoplasma una cadena sencilla. En *Bacteria* Gram positivas, como *Streptococcus* y *Bacillus*, por el contrario, las células sólo toman DNA monocatenario, mientras la banda complementaria es degradada simultáneamente. Sin embargo, en todos los casos, el DNA bicatenario se une más eficientemente a las células.

Durante la transformación, las bacterias competentes unen primero DNA reversiblemente; pronto, sin embargo, esa unión pasa a ser irreversible. Las células compe-

Aprendiendo del pasado... Orígenes de la genética bacteriana

Mientras que la recombinación genética en eucariotas era conocida desde hace tiempo, el descubrimiento de la recombinación genética en bacterias por transformación, transducción y conjugación es un suceso relativamente reciente. De los tres procesos, el descubrimiento de la transformación fue el más significativo, ya que suministró la primera evidencia de que el DNA es el material genético. La primera evidencia de transformación bacteriana la obtuvo el científico británico Fred Griffith al final de la década de los años 20. Griffith estaba trabajando con *Streptococcus pneumoniae* (neumococo), una bacteria cuya capacidad de invasión se debe en parte a la presencia de una cápsula polisacarídica. Se pueden aislar mutantes que carecen de esta cápsula y que son incapaces de causar infección; tales mutantes se llaman cepas R porque sus colonias aparecen rugosas en placas de agar, a diferencia de la apariencia lisa de las cepas capsuladas. Un ratón infectado con sólo unas cuantas células de una cepa lisa (S) muere tras un día o dos de la infección por el neumococo, mientras que incluso grandes inóculos de células R no causan la muerte cuando son inyectadas. Griffith demostró que si las células S muertas por calor se inyectaban junto con células R vivas, se producía una infección mortal y las bacterias aisladas del ratón eran del tipo S. Se conocía la presencia de diferentes cápsulas polisacarídicas en diferentes cepas de neumococos, y fue posible realizar nuevamente este experimento con células S muertas por calor de un tipo diferente a aquel del que derivaba la cepa R. Puesto que las células S vivas recuperadas tenían la cápsula del tipo de las células S muertas por calor, las células R habían sido transformadas en un nuevo tipo y el proceso tenía todas las propiedades de un suceso genético. La explicación molecular de la transformación de los tipos de neumococos fue suministrada por Oswald T. Avery y sus colaboradores del Instituto Rockefeller de Nueva York, en una serie de estudios llevados a cabo en los años 30 que culminaron en su publicación por O. T. Avery, C. M. MacLeod y M. McCarty en 1944, un clásico en la actualidad. Avery y sus colaboradores demostraron que, bajo ciertas condiciones, el proceso de transformación podía efectuarse en el tubo de ensayo en vez de en un ratón, y que un extracto libre de células de las células muertas podía inducir la transformación. En una larga serie de meticulosos experimentos bioquímicos, la fracción activa de los extractos libres de células fue purificada y se demostró que era DNA. La actividad transformante del DNA purificado fue muy alta y sólo se necesitaban muy pequeñas cantidades. Posteriormente, otros investigadores del Instituto Rockefeller mostraron que en neumococos la transformación no sólo se circunscribía a las características capsulares, sino que podía ocurrir también con otras características genéticas del organismo, como la resistencia a antibióticos y la fermentación de azúcares.

En 1953, James Watson y Francis Crick anunciaron su modelo de estructura del DNA, aportando una base teórica sobre cómo el DNA podría actuar como material genético. Así, dos tipos de estudios, el bacteriológico y el bioquímico de Avery y el físico-químico de Watson y Crick, fundamentaron el concepto de que el DNA es el material genético. En años posteriores, este trabajo abriría por completo el campo de la genética molecular.

Aunque la transformación bacteriana fue el resultado de un descubrimiento esencialmente accidental, la conjugación bacteriana fue demostrada inicialmente por Joshua Lederberg y E. L. Tatum en 1946 en experimentos cuidadosamente diseñados para determinar si podían ocurrir procesos sexuales en bacterias. Como parecía que el proceso, si tenía lugar, sería bastante raro (nunca se había observado en el microscopio la existencia de acoplamiento bacteriano, aunque tal evidencia era fácil de obtener en eucariotas), Lederberg desarrolló un método que incluía el uso de mutantes nutricionales de *Escherichia coli*. Afortunadamente, estos mutantes habían sido aislados a partir de la cepa K-12, una de las pocas cepas que se conocen que albergan el plásmido F. El principio consistió en mezclar dos cepas, una que requería biotina y metionina, y otra que requería treonina y leucina, y en sembrar la mezcla en medio mínimo carente de los cuatro factores de crecimiento. Ninguna de las cepas parentales podía crecer en este medio, pero cualquier recombinante podría hacerlo, y cuando se sembraron en placa 10^8 células, se obtuvo un pequeño pero significativo número de colonias. Se emplearon cepas con dos requerimientos nutricionales separados porque sería improbable que ocurriera espontáneamente la reversión de ambas mutaciones, cada una en un gen, en una misma célula. Así, la única explicación del fenómeno era algún tipo de recombinación genética. Para

tentes unen mucho más DNA que las no competentes (hasta 1000 veces más). Como se indicó anteriormente, los tamaños de los fragmentos transformantes son mucho más pequeños que el del genoma y el DNA se degrada más aún durante el proceso de ingestión. Cada célula de *Streptococcus pneumoniae* sólo puede unir unas 10 moléculas de DNA bicatenario de 15-20 kilopares de bases cada una. Sin embargo, a medida que se van tomando, se convierten en piezas monocatenarias de unas 8 kilobases. Los fragmentos de DNA presentes en la mezcla compiten entre sí, y si se añade un exceso de DNA que no tiene el marcador genético se observa un descenso en el número de transformantes. En las preparaciones de DNA transformante, sólo 1 de cada 100-200 fragmentos contiene el marcador que está siendo estudiado. Por tanto, a altas concentraciones de DNA, la competición entre las moléculas de DNA ocasiona la saturación del sistema, de modo que incluso bajo las mejores condiciones resulta imposible transformar todas las células de una población para un marcador genético dado. La frecuencia máxima de transformación obtenida hasta ahora está próxima al 20% de la población; en realidad los valores normalmente obtenidos están entre el 0,1 y el 1%. La concentración mínima de DNA que produce transformantes detectables es de alre-

Courtesy of Rockefeller University Archives

O.T. Avery

demostrar que el proceso requería contacto de célula a célula, y, por tanto, no se debía a un tipo de transformación, se puso en evidencia que cuando los filtrados de cultivo o los extractos se separaban por un filtro permeable a las macromoléculas pero no a las células, la recombinación no ocurría. Aunque inicialmente la conjugación parecía ser un fenómeno muy raro, a principios de los años 50 el científico italiano L.L. Cavalli-Sforza, trabajando en el laboratorio de Lederberg, aisló una cepa de *E. coli* que mostraba alta frecuencia de recombinación. El médico británico William Hayes, que aisló independientemente una cepa Hfr, mostró más tarde que la transferencia genética durante la conjugación era un suceso unidireccional, con las células Hfr actuando como donadores. El experimento de conjugación interrumpida y la demostración del mapa genético circular de *E. coli* fueron realizados posteriormente por Elie Wollman y François Jacob, trabajando con Jacques Monod en el Instituto Pasteur de París. La distinción entre Hfr y F^+ fue realizada por Lederberg, quien también demostró que F^+ se comportaba de un modo infectivo. Lederberg acuñó el término *plásmido* en la década de los 50 para describir estos elementos genéticos, aparentemente extracromosómicos, aunque no encontró amplio uso hasta los años 70 cuando la resistencia a los antibióticos comenzó a ser un importante problema médico.

Courtesy of Cold Spring Harbor Archives

E.L. Tatum (izquierda) y J. Lederberg en 1947

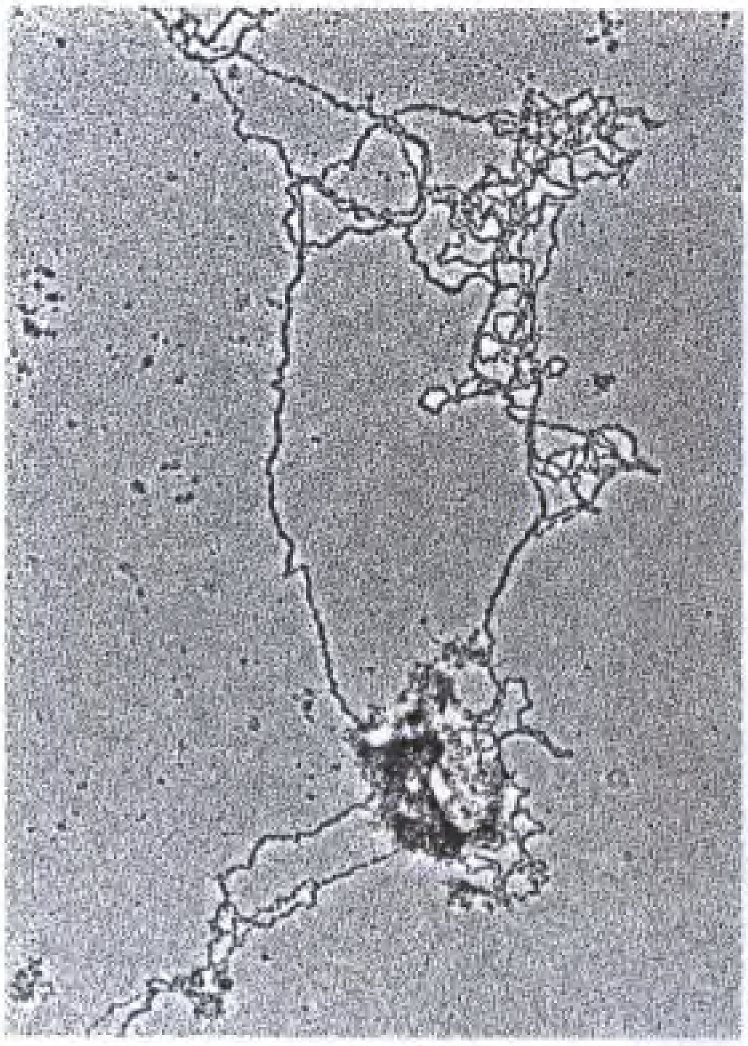
La transducción bacteriana fue descubierta por el científico americano Norton Zinder cuando era un estudiante y trabajaba con Lederberg en la Universidad de Wisconsin sobre la recombinación genética en *Salmonella typhimurium*. El motivo original de tal trabajo era demostrar que la conjugación también ocurría en organismos distintos a *E. coli*, y las técnicas incluían aislamiento de mutantes y cuantificación de la recombinación por observación de crecimiento de colonias sobre medio mínimo. Sin embargo, aunque se obtuvo evidencia de recombinación, pudo demostrarse que *no* se requería el contacto célula a célula. Pese a que esto sugería un tipo de transformación, el proceso no fue afectado por DNasa, y el agente de la transferencia de genes se comportaba como un bacteriófago. El agente de la transferencia de genes podía purificarse por los mismos procedimientos usados para purificar partículas víricas, y la transducción sólo ocurría con células receptoras que tuvieran sitios receptores para el virus en cuestión. Además, la actividad transductora podía eliminarse por tratamiento con sustancias capaces de absorber el virus, tal como células sensibilizadas o anticuerpos. Por tanto, en todos los casos, la actividad transductora y la actividad vírica se comportaban de manera similar. Zinder y Lederberg acuñaron el término *transducción* para designar cualquier proceso de recombinación genética que fuera sólo fragmentaria y no implicara necesariamente contacto celular, pretendiendo abarcar de este modo procesos que incluían DNA libre (transformación) o fagos, pero posteriormente la palabra *transducción* se ha aplicado exclusivamente a la transferencia genética mediada por virus. ■

dedor de 0,00001 µg/ml (1×10^{-5} µg/ml), que es tan baja que resulta químicamente indetectable.

Resulta interesante que en *Haemophilus influenzae* se requiere que el fragmento de DNA tenga una secuencia particular de 11 pares de bases para que ocurra la fijación irreversible y la incorporación subsiguiente. Esta secuencia se encuentra con una frecuencia llamativamente alta en el cromosoma de *Haemophilus*. Este tipo de evidencia, y el hecho de que al menos algunas bacterias se hacen competentes en su medio natural, sugiere que la transformación no es un artefacto de laboratorio, sino que desempeña un papel importante en la transferencia genética en la naturaleza.

Integración del DNA transformante

El DNA transformante se une a la superficie celular por una proteína de unión al DNA, tras lo cual el fragmento bicatenario completo resulta captado por la célula o bien una nucleasa degrada una cadena y la otra es incorporada (Figura 10.13). Tras la incorporación, el DNA se asocia con una proteína específica de la competencia que permanece unida al DNA, posiblemente para protegerlo de ataques por nucleasas, hasta que alcanza el cromosoma, donde es sustituida por la proteína RecA. El DNA se integra luego en el genoma del receptor por procesos de recombinación (Figura 10.13; *véase* también Figura 10.9). Durante la replica-



M. Shioda y S. Takayanagi

Figura 10.12 El cromosoma procariótico visto mediante microscopia electrónica. El cromosoma circular procede del hipertermófilo *Sulfolobus*, un miembro de *Archaea* (*véase* Sección 13.9). *Véase* también Figura 10.16.

ción de este DNA heterodúplex, se forma una molécula de DNA parental y una molécula de DNA recombinante. Tras la segregación por división celular, la última está presente en la célula transformada, que está genéticamente alterada en comparación con el tipo parental. Esta discusión atañe sólo a pequeños fragmentos de DNA *lineal*. Muchas *Bacteria* naturalmente transformables se transforman sólo pobremente por DNA plasmídico, porque el plásmido debe permanecer bicatenario y circular para poder replicarse.

Transfección

Las bacterias se pueden transfornar con DNA extraído de un *virus bacteriano* en vez de a partir de una bacteria, un proceso conocido como **transfección**. Si el DNA es de un bacteriófago lítico, la transfección se puede medir con el ensayo estándar en placa para fagos (*véase* Sección 9.4). La transfección se ha convertido en una herramienta útil para estudiar el mecanismo de la transformación y la recombinación, ya que el pequeño tamaño del genoma del fago permite el aislamiento de poblaciones de moléculas de DNA casi homogéneas. Por el contrario, en la transformación convencional, el DNA transformante es generalmente un conjunto aleatorio de piezas de DNA cromosómico de diferentes longitudes, y esto tiende a complicar los experimentos diseñados para estudiar el mecanismo de la transformación.

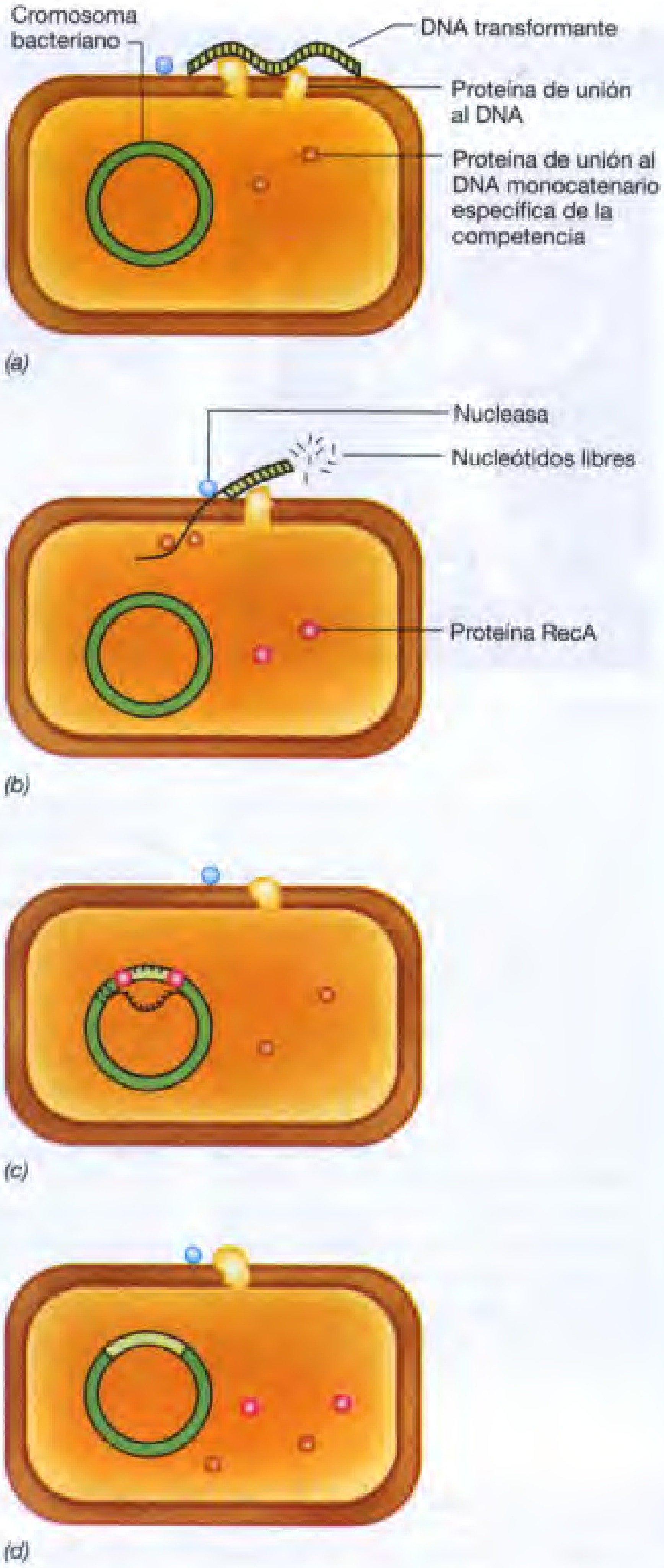


Figura 10.13 Mecanismo de transferencia del DNA por transformación en una bacteria Gram positiva. (a) Fijación del DNA por una proteína de unión del DNA ligada a la membrana. (b) Paso de una de las dos cadenas a la célula mientras la actividad nucleasa degrada la otra cadena. (c) La cadena sencilla dentro de la célula se une a proteínas específicas, y tiene lugar la recombinación con regiones homólogas del cromosoma bacteriano mediada por la proteína RecA. (d) Célula transformada.

Competencia inducida artificialmente

La transformación natural de alta eficacia ocurre sólo en algunas bacterias: *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Neisseria* y *Thermus*, por ejemplo, se transforman fácilmente. Muchos procariotas se transforman muy pobremente o nada en absoluto bajo condiciones naturales. La determinación de cómo inducir competencia en tales bacterias puede suponer un enorme esfuerzo empírico, con variaciones en el medio de cultivo, temperatura y otros factores. Sin embargo, para transferir DNA a las células en experimentos de ingeniería genética (*véase* más adelante en el presente capítulo y *véase* también Capítulo 31), fue necesario encontrar un método para hacer competente a *Escherichia coli*, un organismo Gram negativo. Se ha encontrado que cuando a *E. coli* se trata con altas concentraciones de iones de calcio y luego se mantiene en frío, se convierte en transformable con baja eficiencia. *E. coli* tratada de esta manera toma DNA bicatenario, y así la transformación por DNA plasmídico es relativamente eficiente. No se sabe por qué el tratamiento con calcio funciona de esta manera, pero este procedimiento también funciona con otras *Bacteria* Gram negativas. Sin embargo, este tipo de métodos de inducción artificial está siendo suplantado por un nuevo método denominado *electroporación*.

Transferencia de DNA por electroporación

La **electroporación** es una técnica en la que las células se exponen a campos eléctricos pulsados para abrir pequeños poros en sus membranas. Cuando existen moléculas de DNA fuera de las células durante un pulso eléctrico, pueden entrar en las células a través de estos poros. La electroporación requiere un suministro de potencia sofisticado, ya que los pulsos deben ser controlados cuidadosamente y duran sólo milisegundos. Esta técnica se ha usado para introducir DNA en un gran número de especies diferentes, tanto de *Archaea* como de *Bacteria*, y también en muchas células eucarióticas. Además, la electroporación permite al experimentador transferir un plásmido de una célula a otra si ambos están presentes durante la electroporación. Por tanto, la electroporación permite tanto la salida como la entrada en la célula de pequeñas moléculas de DNA. Este tipo de «transformación» elimina las etapas requeridas para aislar el plásmido de la primera cepa antes de introducirlo en la segunda.

✓ 10.6 Revisión de conceptos

Ciertos procariotas exhiben competencia, un estado en el que las células son capaces de tomar DNA liberado por otras bacterias. Este proceso se llama transformación. Relativamente pocas especies de procariotas pueden ser transformadas de modo natural. Sin embargo, se han desarrollado ciertos procedimientos de laboratorio que hacen posible introducir DNA en organismos no relacionados. La electroporación implica la modificación de la membrana citoplasmática mediante tratamiento con un campo eléctrico para facilitar la toma de DNA.

- ✓ La célula donadora bacteriana en la transformación está probablemente muerta. Explique por qué.
- ✓ Incluso en células naturalmente transformables la competencia es normalmente inducible. ¿Qué significa esto?

10.7 Transducción

En la transducción, el DNA se transfiere de una célula a otra mediante un virus. La transferencia genética de genes del huésped por virus puede ocurrir de dos maneras. En la primera, llamada **transducción generalizada**, el DNA del huésped, que puede proceder de cualquier parte del genoma, pasa a formar parte del DNA de la partícula madura del virus en lugar del genoma del virus. La segunda, llamada **transducción especializada**, ocurre sólo en algunos virus atemperados; el DNA de una región específica del cromosoma bacteriano se integra directamente en el genoma del virus, generalmente reemplazando algunos de los genes del virus. Tanto en la transducción especializada como en la generalizada, la partícula viral es generalmente *defectiva*, ya que algunos genes virales han sido reemplazados por genes bacterianos.

En la transducción generalizada, si los genes del donador no sufren recombinación homóloga con el cromosoma de la bacteria receptora se perderán. No pueden replicarse independientemente y no son parte de un genoma viral. En la transducción especializada también puede ocurrir recombinación homóloga. Sin embargo, puesto que el DNA de la bacteria donadora es ahora parte del genoma de un fago temperado, hay dos posibilidades: (1) el DNA puede integrarse en el cromosoma del huésped durante la lisogenización (*véase* Sección 9.10) y (2) el DNA puede replicarse en el receptor como parte de una infección lítica.

La transducción ocurre en una variedad de especies de *Bacteria*: *Desulfovibrio*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Rhodobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus* y *Xanthobacter*, así como en la *Archaea Methanothermobacter thermoautotrophicus*. No todos los fagos pueden transducir, y no todas las bacterias son transducibles; pero el fenómeno está lo suficientemente extendido para suponer que desempeña un importante papel en la transferencia genética en la naturaleza.

Transducción generalizada

En la transducción generalizada se puede transferir prácticamente cualquier marcador genético desde el donador al receptor. La transducción generalizada fue descubierta y estudiada en la bacteria *Salmonella enterica* con el fago P22 y ha sido también estudiada con el fago P1 en *Escherichia coli*. Un ejemplo de cómo se pueden formar las *partículas transductantes* se ofrece en la Figura 10.14. Cuando la población de bacterias sensibles se infecta con un fago, pueden iniciarse las etapas del ciclo lítico del fago. Durante una infección lítica, las enzimas responsables del empaquetamiento del DNA vírico en el bacteriófago, a veces introducen DNA del hospedador de forma accidental. La partícula resultante es una *partícula transductora*. Cuando la célula se lisa, estas partículas se liberan junto con los viriones normales, de manera que el lisado contiene una mezcla de viriones y partículas transductantes. Puesto que las partículas transductantes no pueden iniciar una infección viral normal (no contienen DNA vírico), se les llama *defectivas*. Cuando este lisado se usa para infectar una po-

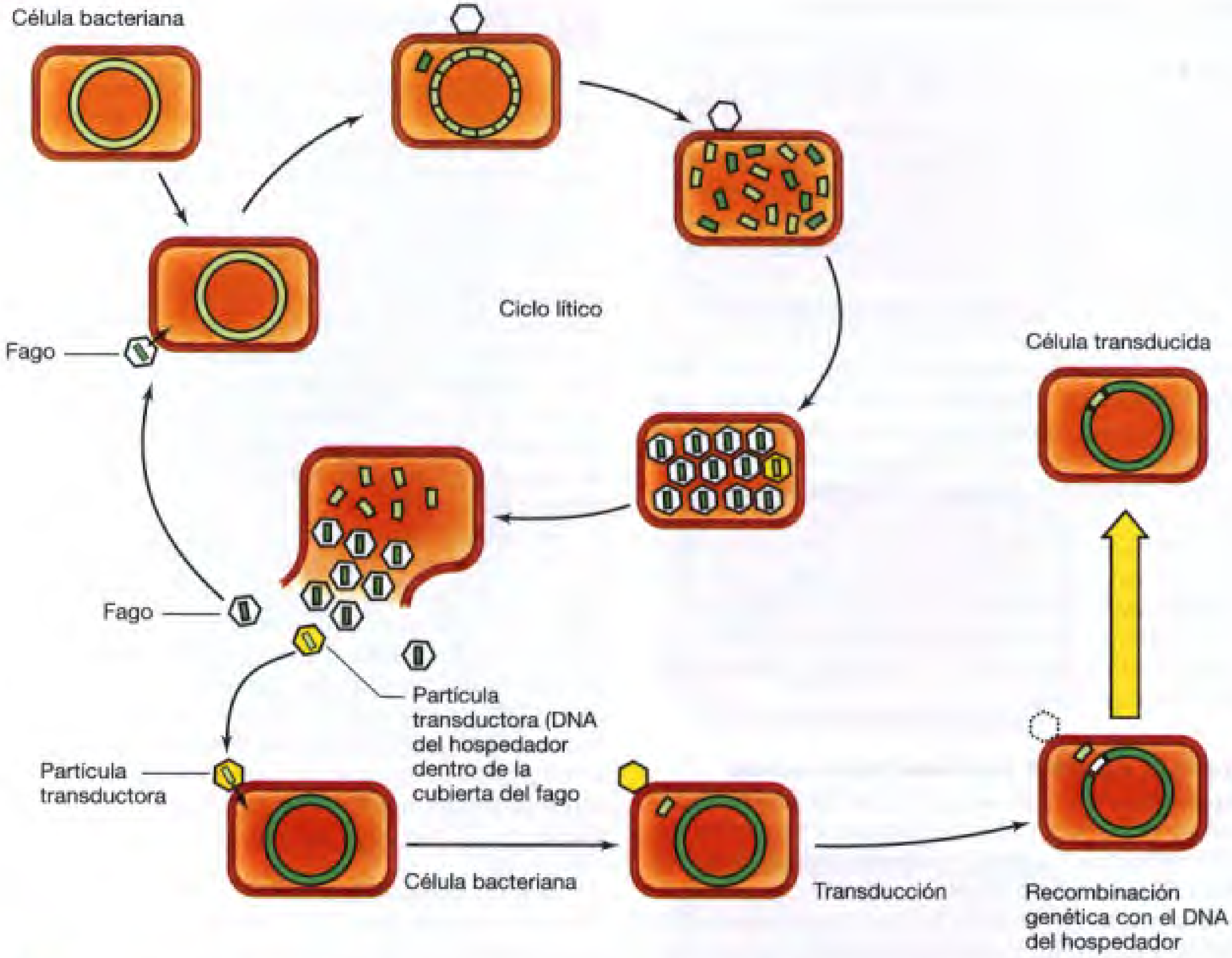

Célula bacteriana
Fago
Ciclo lítico
Célula transducida
Fago
Partícula transductora (DNA del hospedador dentro de la cubierta del fago
Partícula transductora
Célula bacteriana
Transducción
Recombinación genética con el DNA del hospedador

Figura 10.14 Transducción generalizada: un posible mecanismo por el que pueden formarse partículas del virus (fago) conteniendo DNA del hospedador.

blación de células receptivas, la mayoría de las células resultan infectadas por un virus normal. Sin embargo, una pequeña proporción de la población recibe partículas transductantes que inyectan el DNA que recibieron de la anterior bacteria hospedadora. Aunque este DNA no puede replicarse, puede sufrir recombinación genética con el DNA del nuevo hospedador. Puesto que sólo una pequeña proporción de las partículas del lisado son del tipo transductor defectivo, y cada uno contiene sólo un pequeño fragmento de DNA donador, la probabilidad de que una partícula transductora contenga un determinado gen es muy baja, y normalmente alrededor de una célula de cada $10^6 - 10^8$ resulta transducida con un marcador genético dado.

Los fagos capaces de formar partículas transductantes pueden ser atemperados o virulentos, y los principales requisitos son que posean un mecanismo de empaquetamiento del DNA que permita el reconocimiento accidental del DNA del hospedador y que el empaquetamiento ocurra antes de que el genoma del hospedador sea completamente degradado. La detección de la transducción es más segura cuando la multiplicidad de infección del fago con respecto al hospedador es baja, de manera que una célula huésped es infectada por sólo una partícula fágica; a alta multiplicidad de infección, los viriones del lisado pueden matar las células.

Transducción especializada

La transducción especializada permite la transferencia de DNA de una bacteria a otra con una frecuencia baja. Sin embargo, la transducción especializada permite una transferencia muy eficiente y, además, que una pequeña región del cromosoma bacteriano se replique independientemente del resto. El ejemplo que emplearemos para comentar la transducción especializada fue el primero que se descubrió y representa la transducción de los genes de la galactosa por el fago atemperado lambda de *Escherichia coli*.

Como se ha comentado (*véase* Sección 9.10), cuando una célula resulta lisogenizada por lambda, el genoma del fago se integra en el DNA del hospedador en un sitio específico. La región en la que se integra lambda está adyacente al grupo de genes del hospedador que controla la utilización de la galactosa (*véase* Figura 9.21). Una vez el DNA de lambda se inserta en ese sitio en el hospedador, la replicación del DNA vírico queda bajo el control del hospedador. Mediante inducción (por ejemplo, por radiación ultravioleta), el DNA viral se separa del DNA del huésped por un proceso inverso al de integración (Figura 10.15). De ordinario, cuando la célula lisogénica es inducida, el DNA de lambda se escinde como una unidad. Sin embargo, bajo ciertas condiciones raras, el genoma del fago puede escindirse de forma incorrecta. Alguno de los genes bacterianos adyacentes (por ejemplo, el operón galactosa) se escinde junto con el DNA del fago. Al mismo tiempo, algunos genes fágicos se quedan allí. Un tipo de partícula fágica alterada, llamada **lambda dgal** o *λ dgal* (*dgal* significa «defectivo, galactosa»), es defectiva a causa de los genes fágicos perdidos y no forma virus maduros. Sin embargo, un **fago auxiliar**, puede suministrar las funciones que faltan en las partículas defectivas. Este fago «auxiliar» es idéntico al lambda original. Así, el lisado del cultivo obtenido contiene algunas partículas *λ dgal* mezcladas con gran número de viriones de lambda normales.

Cuando un cultivo bacteriano galactosa-negativo se infecta con este lisado y se seleccionan transformantes *gal*$^+$, muchos son doblemente lisogénicos y llevan tanto lambda como *λ dgal*. (Nótese que la bacteria es diploide para la región *gal*. Esto es importante para la realización de los test de complementación en bacterias; *véase* Sección 10.10.) Cuando se induce uno de estos lisógenos, se produce un lisado que contiene aproximadamente el mismo número de lambda que de *λ dgal*. Tal lisado puede transducir con alta eficiencia, aunque sólo un grupo restringido de genes *gal*.

Para que el fago sea viable, existe un límite máximo en la cantidad de DNA del fago que puede ser reemplazado por DNA del hospedador, ya que se debe conservar suficiente DNA del fago para suministrar información para la producción de las proteínas de la cubierta del fago, así como para otras proteínas necesarias para la lisis y la lisogenización. Sin embargo, si se usa un fago auxiliar junto al defectivo en una infección mixta, entonces se necesita incluso menos información en el fago defectivo para la transducción. En estas condiciones, la producción de una partícula transductante sólo necesita la región *att* (del inglés, *attachment*), el sitio *cos* (extremos cohesivos, para el empaquetamiento), y el origen de replicación (*véanse* el mapa genético de lambda en la Figura 9.18 y la Sección 9.10).

Una diferencia importante entre transducción generalizada y especializada radica en la forma en que se puede formar el lisado transductor. En la transducción especializada *debe* ocurrir por inducción de un lisógeno, mientras que en la transducción generalizada puede ocurrir de este modo o por infección de una bacteria no lisogénica, con posterior replicación del fago y lisis de la célula.

Aunque hemos comentado la transducción especializada utilizando el sistema lambda-*gal*, el fago lambda y su pariente el fago ϕ80, se han utilizado con frecuencia para formar fagos de transducción especializada que cubren muchas regiones específicas del genoma de *E. coli*. Además, mediante técnicas de ingeniería genética, se pueden construir fagos lambda que contengan genes de cualquier organismo (*véase* Sección 10.16).

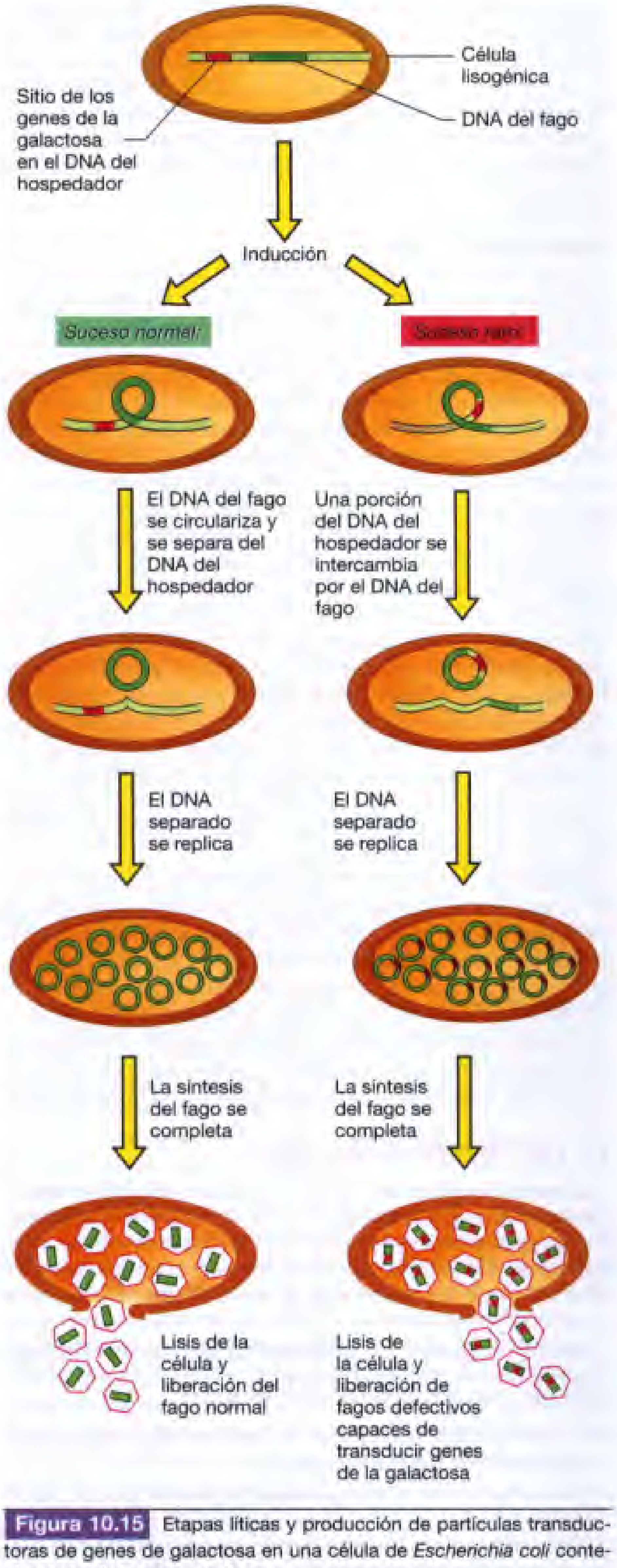

Célula lisogénica
Sitio de los genes de la galactosa en el DNA del hospedador
DNA del fago
Inducción
Suceso normal:
Suceso raro:
El DNA del fago se circulariza y se separa del DNA del hospedador
Una porción del DNA del hospedador se intercambia por el DNA del fago
El DNA separado se replica
El DNA separado se replica
La síntesis del fago se completa
La síntesis del fago se completa
Lisis de la célula y liberación del fago normal
Lisis de la célula y liberación de fagos defectivos capaces de transducir genes de la galactosa

Figura 10.15 Etapas líticas y producción de partículas transductoras de genes de galactosa en una célula de *Escherichia coli* conteniendo lambda como profago.

La transducción especializada en *Bacteria* es similar a la situación comentada con los retrovirus (*véase* Sección 9.12) donde ciertos genes del hospedador pueden ser incorporados en el genoma retroviral y transmitidos (frecuentemente en una forma modificada) a hospedadores posteriores. Estos genes se han detectado en los retrovirus debido a que son *oncogenes*, implicados en el desarrollo de un cáncer.

Conversión fágica

La conversión fágica es un fenómeno en ciertos aspectos análogo a la transducción especializada. Cuando un fago temperado normal (esto es, uno no defectivo) lisogeniza una célula y su DNA pasa al estado de profago, la bacteria lisogénica es inmune a una nueva infección por un fago del mismo tipo. Esta adquisición de inmunidad se puede considerar como un cambio de fenotipo. En ciertos casos, se pueden detectar otras alteraciones en la célula lisogenizada, que parecen no estar relacionadas con el sistema de inmunidad fágica. Tal cambio, provocado por la lisogenización con un fago temperado normal se llama **conversión fágica**.

Hay dos casos de conversión fágica que han sido estudiados muy especialmente. Uno implica un cambio en la estructura de un polisacárido de la superficie celular de *Salmonella anatum* tras lisogenización con el fago ϵ^{15}. El segundo implica la conversión de cepas no productoras de toxinas de *Corynebacterium diphteriae* (el agente causal de la difteria) en cepas productoras de toxina (patógenas) por lisogenización con el fago β (*véase* Sección 26.3). En estas situaciones, la información para la producción de estas nuevas sustancias forma, aparentemente, parte integral del genoma del fago y se transfiere exclusivamente por infección del fago y lisogenización.

La lisogenia tiene, probablemente, un fuerte valor selectivo para la célula hospedadora, ya que confiere resistencia a la infección por virus del mismo tipo. La conversión fágica parece tener también una considerable significación evolutiva, ya que provoca una alteración genética eficiente en las células hospedadoras. Muchas bacterias aisladas de la naturaleza son lisogénicas. Parece, pues, razonable concluir que la lisogenia es el estado normal y, a menudo, puede ser esencial para la supervivencia del hospedador en la naturaleza.

✓ 10.7 Revisión de conceptos

La transducción implica transferencia de genes del hospedador de una bacteria a otra por un virus. En la transducción generalizada, partículas virales defectivas incorporan al azar fragmentos de DNA celular; prácticamente cualquier gen del donador puede ser transferido, pero la eficacia es baja. En la transducción especializada, el DNA de un virus atemperado se escinde incorrectamente y se lleva con él genes adyacentes del hospedador; sólo se transducen genes cercanos al punto de integración, pero la eficiencia puede ser alta.

- ✓ ¿Cuál es la diferencia más importante entre la transducción generalizada y la transformación?
- ✓ En la transducción especializada, el DNA donador puede replicarse dentro de la célula receptora sin que tenga lugar la recombinación homóloga, pero esto *no* es así en la transducción generalizada. Explique por qué.

10.8 Plásmidos

Antes de considerar el tercer método de transferencia genética, la **conjugación**, debemos comentar los *plásmidos*. Los **plásmidos** son generalmente elementos que se replican independientemente del cromosoma del hospedador (*véase* Sección 7.4).

A diferencia de los virus, los plásmidos no tienen una forma extracelular y existen dentro de las células como ácidos nucleicos. Sin embargo, la distinción entre virus y plásmidos es a veces difícil. Como hemos comentado, la forma de profago de algunos virus atemperados, tal como el bacteriófago P1, se replica independientemente del cromosoma del hospedador de manera análoga a la replicación de un plásmido (*véase* Sección 9.10).

Ya destacamos antes (*véase* Sección 7.4) que es posible diferenciar entre un plásmido y un cromosoma en procariotas, porque los plámidos no llevan genes que sean requeridos por el hospedador en todas las condiciones. Esto puede ser difícil de probar, y, por tanto, a veces puede ser difícil distinguir en procariotas entre cromosomas y plásmidos muy grandes.

A pesar de estas dificultades, se conocen miles de tipos de plásmidos diferentes. De hecho, sólo en cepas de *Escherichia coli* se han aislado más de 300 plásmidos naturales. En esta sección discutiremos las propiedades de algunos de ellos.

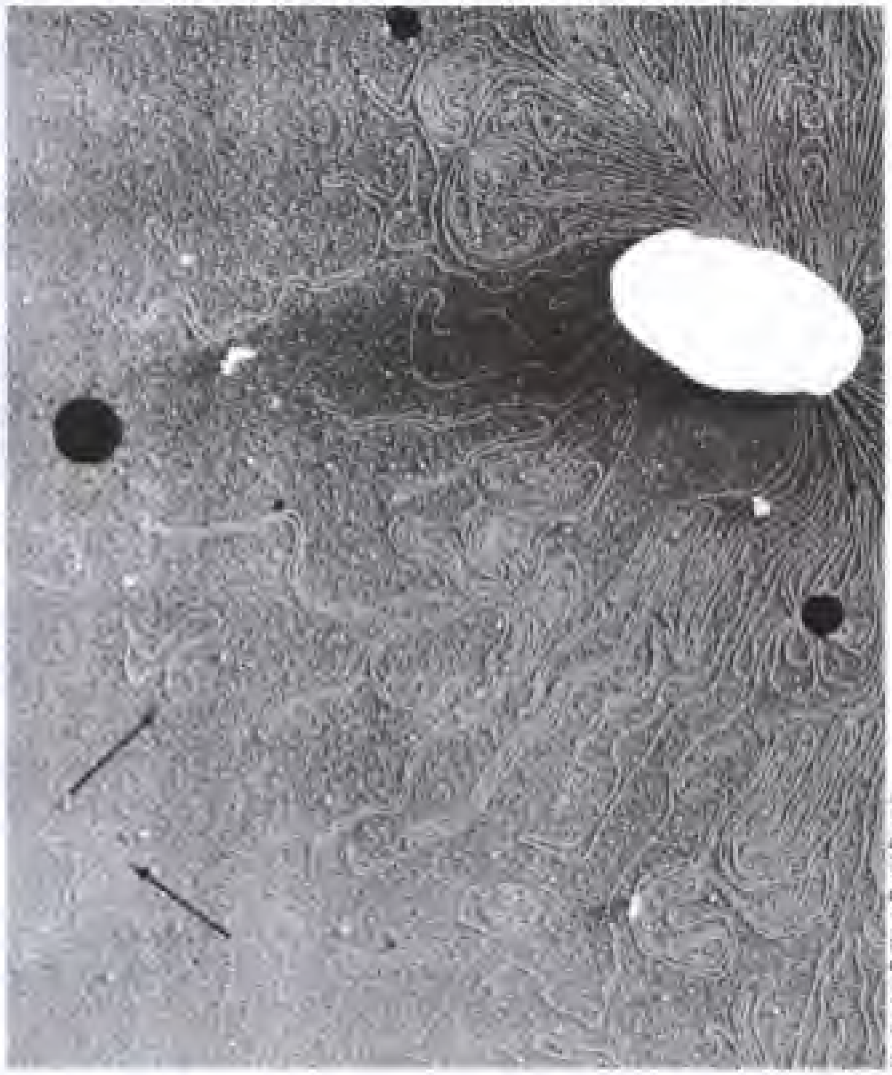
Naturaleza física de los plásmidos

Casi todos los plásmidos conocidos son DNA bicatenario. La mayoría de los plásmidos son circulares, pero también se conocen muchos plásmidos lineales. El tamaño de los plásmidos que existen en la naturaleza varía de 1 a más de 1000 kilopares de bases. El plásmido típico es una molécula de DNA bicatenario y circular, cuyo tamaño es menor que la veinteava parte del tamaño de un cromosoma (Figura 10.16). La mayor parte del DNA plasmídico aislado de las células está en una configuración superenrollada, que es más compacta, dentro de la célula (*véase* Figura 7.10).

En general, el aislamiento de DNA plasmídico puede realizarse teniendo en cuenta las propiedades físicas de las moléculas de DNA superenrollado. Aunque los cromosomas están también superenrollados en la célula, el aislamiento de DNA cromosómico casi siempre conlleva la rotura de las cadenas y la pérdida consiguiente del superenrollamiento. La separación puede pues hacerse por una variedad de técnicas, incluyendo la ultracentrifugación y la electroforesis en geles de agarosa (*véase* Sección 10.12).

Replicación de los plásmidos

La mayoría de las enzimas implicadas en la replicación de los plásmidos son enzimas celulares, de modo que los genes del plásmido que controlan su propia replicación se limitan principalmente a controlar temporalmente el proceso de iniciación y el reparto de los plásmidos replicados entre las células hijas. También, los diferentes plásmidos están presentes en las células en un número particular de moléculas plasmídicas por célula; esto se denomina *número de copias*. Algunos plásmidos están presentes en la célula en 1-3 copias,



Huntington Potter y David Dressler

Figura 10.16 Cromosoma bacteriano y plásmidos bacterianos vistos por microscopia electrónica. Los plásmidos (flechas) son estructuras circulares, mucho más pequeñas que el DNA cromosómico. La célula (estructura grande blanca) se lisó suavemente para que el DNA se conservara intacto.

mientras otros pueden estar presentes en más de 100 copias. El número de copias está controlado por genes del plásmido y por interacciones entre el hospedador y el plásmido.

La mayor parte de los plásmidos de las bacterias Gram negativas se replican de modo similar al descrito para el cromosoma (*véase* Sección 7.6). Esto implica iniciación y replicación en un origen y replicación bidireccional alrededor del círculo, originando un intermediario *theta*. Sin embargo, algunos plásmidos tienen una replicación *unidireccional*. Dado el pequeño tamaño del plásmido en comparación con el del cromosoma, el proceso completo de replicación ocurre muy rápido, quizá en la décima parte del ciclo de división celular.

La mayoría de los plásmidos de *Bacteria* Gram positivas se replican por el mecanismo del círculo rodante similar al usado por el fago ϕX174 (*véanse* Sección 16.2 y Figura 16.4). Este mecanismo origina un intermediario monocatenario, y por ello estos plásmidos se designan a veces como *plásmidos con DNA monocatenario*. La mayoría de los plásmidos lineales conocidos se replican mediante un mecanismo que incluye la unión de una proteína al extremo 5' de cada cadena que se usa para iniciar la síntesis de DNA (*véanse* Figuras 7.24 y 16.22).

Algunas células bacterianas individuales también contienen varios tipos diferentes de plásmidos; por ejemplo, *Borrelia burgdorferi* (el agente etiológico de la enfermedad de Lyme, *véase* Sección 27.4) contiene 17 plásmidos diferentes circulares y lineales. La capacidad de dos tipos diferentes de plásmidos para replicarse en la misma célula está controlada por genes plasmídicos implicados en el control de la replicación del DNA. Una observación bastante común es que, cuando un plásmido se transfiere a una célula que contiene otro plásmido, el segundo plásmido no puede mantenerse y se pierde durante la replicación celular subsiguiente. Se dice que los dos plásmidos son **incompatibles**. Se ha reconocido la existencia de un cierto número de grupos de incompatibilidad (Inc), con los plásmidos de un grupo excluyéndose entre sí, pero siendo capaces de coexistir con los plásmidos de otros grupos. Los plásmidos de un grupo de incompatibilidad comparten un mecanismo común para regular su replicación, y, por tanto, están *relacionados* entre sí. En consecuencia, aunque una célula bacteriana puede contener diferentes tipos de plásmidos, no están estrechamente relacionados porque deben ser compatibles.

Algunos plásmidos, llamados *episomas*, tienen la capacidad de integrarse en el cromosoma, y bajo tales condiciones su replicación está bajo el control del cromosoma. Esta situación es notablemente semejante a la de varios virus cuyos genomas se incorporan en el genoma del hospedador (por ejemplo, *véanse* Secciones 9.10, 16.5, 16.10 y 16.14). Los plásmidos que tienen esta capacidad de integrarse se llaman episomas. A veces, los plásmidos se pueden eliminar de las células hospedadoras por diversos tratamientos. Este proceso, denominado **curación**, parece ser el resultado de inhibir la replicación del plásmido sin inhibir paralelamente a la replicación del cromosoma y, por tanto, de la dilución del plásmido como consecuencia de la división celular. La curación puede ocurrir espontáneamente pero se incrementa considerablemente con el uso de colorantes de acridina que se insertan en el DNA, o de otros tratamientos que parecen interferir más con la replicación del plásmido que con la del cromosoma. La electroporación puede utilizarse también para curar de plásmidos una célula (*véase* Sección 10.6).

Muchas de estas características están ejemplificadas en un plásmido muy bien caracterizado llamado el *plásmido F*. El plásmido F es una molécula de DNA circular de 99.159 pares de bases. Las células que lo contienen pueden ser fácilmente curadas con naranja de acridina. La Figura 10.17 muestra un mapa genético del plásmido F. Una región del plásmido contiene genes implicados en regular la replicación del DNA. También contiene varios elementos transponibles (*véase* Sección 10.11) implicados en su capacidad para funcionar como un episoma. Por último, tiene una extensa región de DNA, la región *tra*, que contiene genes que permiten su transferencia de una célula a otra.

Transferencia de plásmidos de célula a célula

Puesto que una de las características definitorias de un plásmido es que carece de una forma extracelular distintiva, uno podría suponer que la transmisión de los plásmidos está exclusivamente confinada a las células hijas durante la división celular. Puesto que algunas células procarióticas pueden tomar DNA libre del ambiente (*véase* Sección 10.6), es posible que la lisis del hospedador, como quiera que ocurra, pueda poner el plásmido en contacto con un

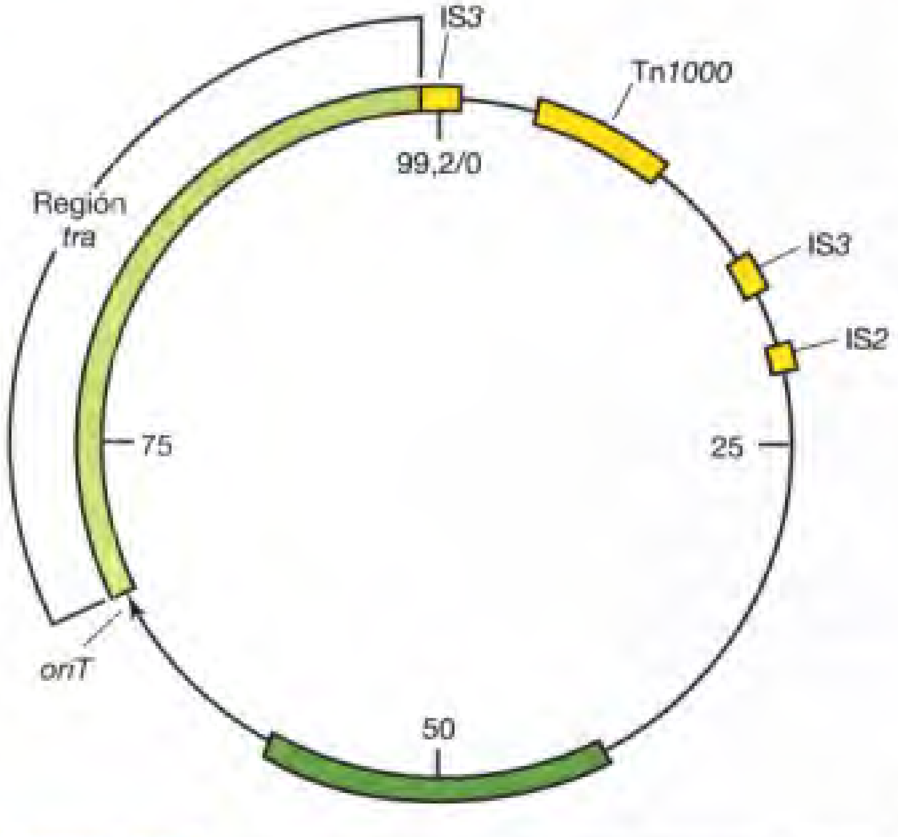


Figura 10.17 Mapa genético del plásmido F (fertilidad) de *Escherichia coli*. Los números en el interior indican el tamaño del plásmido en kilopares de bases (el tamaño exacto es 99.159 bp). La región mostrada en verde oscuro en la parte inferior del mapa contiene genes responsables principalmente de la replicación y segregación del plásmido F en células que crecen normalmente. La región mostrada en verde claro, la región *tra*, contiene los genes implicados en la transferencia conjugativa. La secuencia *oriT* es el origen de la transferencia durante la conjugación. La flecha indica la dirección de la transferencia (la región *tra* se transferiría en último lugar). Las regiones de F mostradas en amarillo son elementos transponibles por donde puede ocurrir la integración en elementos idénticos del cromosoma bacteriano dando lugar a la formación de diferentes cepas Hfr (*véase* Sección 10.10).

nuevo hospedador. Sin embargo, este proceso ocurre de manera natural en unas pocas especies bacterianas y no es probable que represente una transferencia de plásmidos significativa de una célula a otra. El principal mecanismo de transmisión de célula a célula es la **conjugación,** que es una función codificada por algunos plásmidos. La conjugación es un proceso replicativo y ambas células terminan con copias del plásmido (Figura 10.18).

Los plásmidos que gobiernan su propia transferencia de una célula a otra por contacto se llaman **conjugativos,** pero no todos los plásmidos son conjugativos. La transmisibilidad por conjugación está controlada por un conjunto se genes dentro del plásmido que constituye la *región tra*. La región *tra* contiene genes que codifican proteínas que funcionan en la transferencia del DNA y en su replicación, y otras que funcionan en la formación de parejas conjugativas. La presencia de una región *tra* en un plásmido puede tener otra importante consecuencia si el plásmido se integra en el cromosoma. En este caso, el plásmido puede *movilizar* la transferencia del DNA cromosómico de una célula a otra. Las cepas de bacterias que transfieren grandes cantidades de DNA cromosomal durante la conjugación se llaman *Hfr,* alta frecuencia de recombinación (del inglés, *High frequency of recombination*). El uso de la conjugación para transferir genes del huésped se comentará en la siguiente sección.

Algunos plásmidos conjugativos de *Pseudomonas* tienen un amplio rango de hospedadores, es decir, son transferibles a una amplia variedad de otras Gram negativas del dominio *Bacteria*. Algunos plásmidos conjugativos pueden transferir información genética entre organismos muy distantes filogenéticamente. Así, dentro de *Bacteria*, se ha demostrado transferencia entre bacterias Gram negativas y Gram positivas, entre *Bacteria* y células de plantas, y entre *Bacteria* y hongos. Incluso si el plásmido no puede replicarse en el nuevo hospedador, la transferencia misma del DNA puede tener importantes consecuencias evolutivas, así como estar relacionada con procesos patogénicos, si se puede recombinar con el genoma del nuevo hospedador.

Tipos de plásmidos y su significación biológica

Todos los plásmidos deben llevar genes que aseguren su propia replicación. Sin embargo, en el caso de muchos plásmidos conocemos muy poco de la naturaleza de los otros genes que llevan. Éstos son los llamados *plásmidos crípticos* y fueron descubiertos por métodos físicos (por ejemplo, al examinar un extracto celular mediante electroforesis en gel). Como hemos visto, algunos plásmidos también llevan genes necesarios para la conjugación, y pueden detectarse biológicamente por las propias funciones de transferencia o por la sensibilidad a ciertos virus (*véase* Sección 16.1). Aunque los plásmidos no llevan genes que sean esenciales para el huésped bajo todas las condiciones, la presencia de plásmidos en una célula puede tener una profunda influencia en el fenotipo celular. En algunos casos, el plásmido codifica propiedades que pueden ser fundamentales para la bacteria en cuestión; por ejemplo, la capacidad de *Rhizobium* para interactuar con plantas (*véase* Sección 19.22). Algunos plásmidos

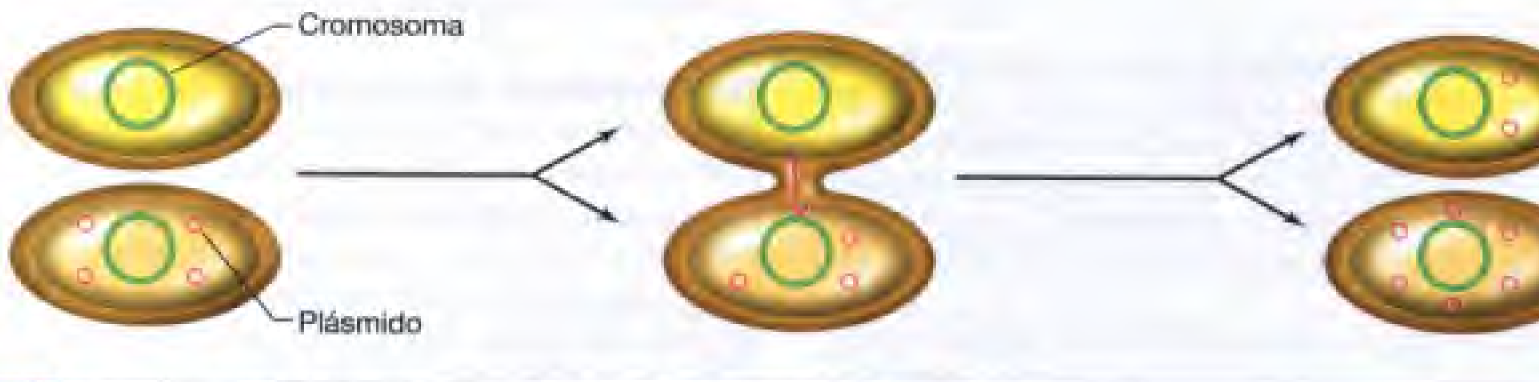


Figura 10.18 Transferencia del plásmido de célula a célula durante la conjugación.

de *Pseudomonas* transfieren la información genética para rutas bioquímicas que degradan compuestos orgánicos poco comunes tales como alcanfor, octano y naftaleno.

Los plásmidos pueden llevar una amplia variedad de genes. La única limitación es que los genes que transportan no interfieran con su propia replicación o con la supervivencia del hospedador. Como los plásmidos pueden ser grandes y llevar muchos genes diferentes, su clasificación dentro de una categoría fenotípica sencilla no es siempre fácil. Como veremos, un único plásmido puede conferir muchos fenotipos diferentes a su célula hospedadora. En la Tabla 10.3, se presentan algunos de los fenotipos que los plásmidos pueden conferir a los procariotas. Parece probable que prácticamente todos los grupos procarióticos posean plásmidos. En lo que resta de esta sección comentaremos algunos de los muchos fenotipos que los plásmidos pueden conferir a las células.

Plásmidos de resistencia

Los *plásmidos de resistencia* (*plásmidos R*) constituyen uno de los grupos mejor estudiados de plásmidos. Confieren resistencia a los antibióticos y a otros inhibidores del crecimiento. Fueron descubiertos en Japón, en cepas bacterianas entéricas que habían adquirido resistencia a varios antibióticos (resistencia múltiple) y desde entonces se han encontrado en otras partes del mundo. La aparición de bacterias resistentes a varios antibióticos tiene una considerable importanca médica y se correlaciona con el amplio uso de antibióticos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Poco después de que se aislaran estas cepas resistentes, se comprobó que podían transmitir la resistencia a cepas sensitivas mediante contacto célula a célula. La naturaleza infecciosa de los plásmidos R conjugativos permite una rápida diseminación de estas características por las poblaciones bacterianas.

Los plásmidos R pueden llevar una gran variedad de genes de resistencia a antibióticos. En general, estos genes codifican proteínas que inactivan el antibiótico o afectan a su transporte hacia el interior de la célula. El plásmido R100, por ejemplo, es un plásmido de 94,3 kilopares de bases (Figura 10.19) que lleva genes de resistencia a sulfamidas, estreptomicina y espectinomicina, ácido fusídico, cloranfenicol y tetraciclina. R100 también lleva genes que confieren resistencia al mercurio (*véase* Sección 19.17). R100 puede transferirse entre bacterias entéricas de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella* y *Shigella*, pero no se transfiere a la bacteria no entérica *Pseudomonas*. También se conocen plásmidos R con genes de resistencia a la mayoría de los antibióticos. Muchos de los elementos de resistencia a drogas que se encuentran en plásmidos como el R100 son elementos transponibles (*véase* Sección 10.11), lo que unido al hecho de que estos plásmidos son conjugativos, los convierte en una amenaza para las terapias antibióticas tradicionales.

Toxinas y otros determinantes de virulencia

En el Capítulo 21, se expusieron las características fisiológicas y genéticas que capacitan a los microorganismos a colonizar hospedadores y poner en marcha infecciones que pueden causar daños. En el presente contexto, destacaremos meramente las dos características más importantes que determinan la virulencia: (1) la capacidad de los microorga-

TABLA 10.3 Algunos fenotipos conferidos por plásmidos en procariotas

Clase de fenotipo[a]	Organismos[b]
Producción de antibióticos	*Streptomyces*
Conjugación	*Escherichia, Pseudomonas, Rhizobium, Staphylococcus, Streptococcus, Sulfolobus* y *Vibrio*
Funciones fisiológicas	
Degradación de octano, alcanfor y naftaleno	*Pseudomonas*
Degradación de herbicidas	*Alcaligenes*
Formación de acetona y butanol (*véase* Sección 30.11)	*Clostridium*
Utilización en lactosa, sacarosa o urea y fijación de nitrógeno	Bacterias entéricas
Nodulación y fijación simbiótica del nitrógeno (*véase* Sección 19.22)	*Rhizobium*
Producción de pigmentos	*Erwinia, Staphylococcus*
Resistencia	
Resistencia a antibióticos (*véase* Sección 20.12)	*Campylobacter*, Bacterias entéricas, *Neisseria* y *Staphylococcus*
Resistencia a cadmio, cobalto, mercurio, níquel y/o zinc (*véase* Sección 19.16)	*Acidocella, Alcaligenes, Listeria, Pseudomonas* y *Staphylococcus*
Resistencia a bacteriocinas (y producción)	*Bacillus*, Bacterias entéricas, *Lactococcus* y *Propionibacterium*
Virulencia	
Invasión de la célula hospedadora	*Salmonella, Shigella* y *Yersinia*
Coagulasa, hemolisina y enterotoxina (*véanse* Secciones 21.9 y 21.11)	*Staphylococcus*
Enterotoxina y antígeno K (*véanse* Secccioness 12.11 y 21.11)	*Escherichia*
Tumorgenicidad en plantas (*véase* Sección 19.21)	*Agrobacterium*

[a] Sólo se dan algunos de los muchos fenotipos asociados con plásmidos.

[b] Sólo se dan algunos ejemplos bien caracterizados. Todos los organismos relacionados pertenecen a *Bacteria* excepto *Sulfolobus*, que es un miembro de *Archaea*.

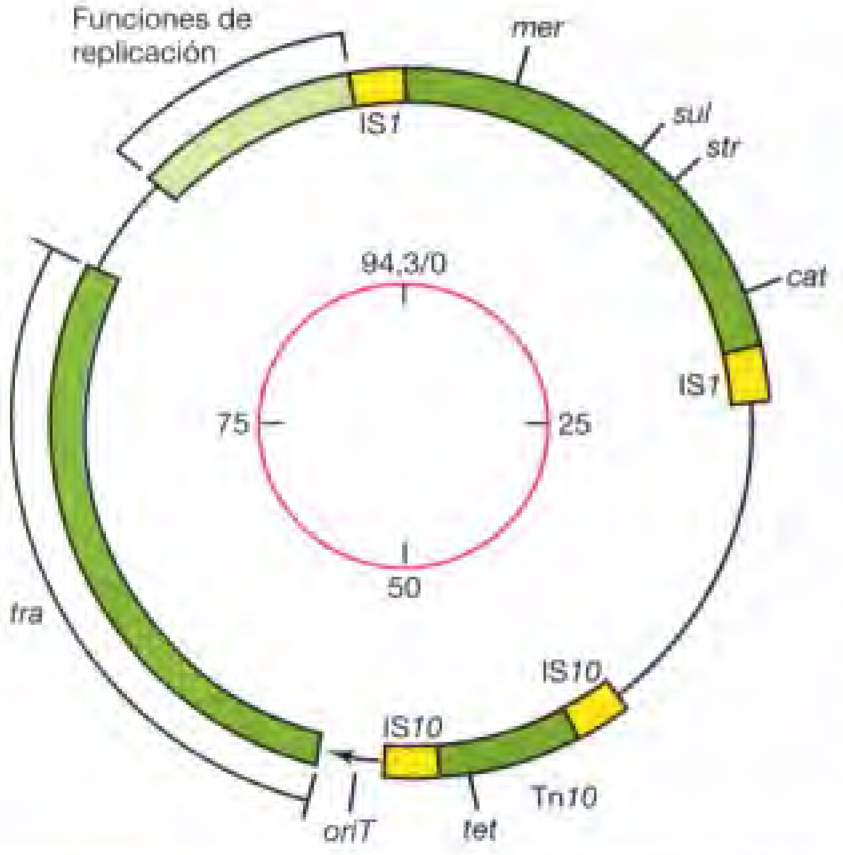


Figura 10.19 Mapa genético del plásmido de resistencia R100. El círculo interior muestra el tamaño del plásmido en kilopares de bases. El círculo externo muestra la localización de los principales genes de resistencia a antibióticos y otras funciones importantes: *cat*, resistencia a cloranfenicol; *oriT*, origen de transferencia; *mer*, resistencia al mercurio; *sul*, resistencia a la sulfonamida; *str*, resistencia a estreptomicina; *tra*, funciones de transferencia. También se indican las localizaciones de las secuencias de inserción (IS) y del transposón Tn*10*. En la región comprendida entre los 88 y 92 kilopares de bases se encuentran varios genes implicados en la replicación del plásmido.

nismos para colonizar sitios específicos del huésped; y (2) la formación de sustancias (toxinas, enzimas y otras moléculas) que causan daño al huésped. En varias bacterias patógenas, se ha demostrado que cada uno de estos determinantes de virulencia residen en plásmidos. Por ejemplo, las cepas enteropatogénicas de *Escherichia coli* se caracterizan por su capacidad para colonizar el intestino delgado y producir una toxina que causa los síntomas de la diarrea. La colonización requiere la presencia de una proteína de superficie llamada factor antigénico de colonización (CFA), codificado por un plásmido, que confiere a las células la capacidad para unirse a las células epiteliales del intestino. En las cepas enteropatogénicas de *E. coli*, se conocen al menos dos toxinas codificadas en un plásmido: la *hemolisina*, que lisa los glóbulos rojos, y la *enterotoxina*, que induce secreción masiva de agua y sales al intestino. La enterotoxina es responsable de la inducción de la diarrea, como se comentará en el Capítulo 21. La patogénesis del género *Yersinia*, el agente causal de la plaga (*véase* Sección 27.6), requiere la expresión y secreción de proteínas de la cubierta de *Yersinia* (Yops) y del antígeno V. Estas proteínas tienen funciones que permiten a la bacteria superar las funciones defensivas del hospedador. Los genes que codifican y regulan estas proteínas se encuentran en un plásmido de virulencia.

Se sabe que algunos factores de virulencia están codificados por fagos, mientras que otros están codificados por *elementos genéticos móviles*: transposones y bacteriófagos. Se conocen varios ejemplos en los que los genes responsables de un tipo particular de infección están presentes en diferentes elementos genéticos dentro de la misma célula. Por ejemplo, los genes que codifican los determinantes de virulencia de las cepas de *E. coli* productoras de la toxina shiga están localizadas en el cromosoma, en un bacteriófago y en un plásmido de virulencia.

Bacteriocinas

Muchas bacterias producen agentes que inhiben o matan a otras especies estrechamente relacionadas e incluso a cepas de la misma especie; estos agentes se llaman **bacterocinas** para distinguirlos de los antibióticos, que tienen un espectro de actividad más amplio. Las bacteriocinas son péptidos sintetizados en los ribosomas (aunque varios de ellos requieren una extensa modificación postraduccional para adquirir actividad). El gen estructural de la bacteriocina y los genes que codifican proteínas implicadas en el procesamiento y transporte de la bacteriocina (y en exhibir inmunidad a su acción) se encuentran, a menudo, en un plásmido o en un transposón. Las bacteriocinas se designan de acuerdo con la especie del organismo que las produce. Así, *Escherichia coli* produce *colicinas*, codificadas en plásmidos Col, *Bacillus subtilis* produce *subtilisinas*, y así sucesivamente.

Los plásmidos Col de *Escherichia coli* codifican varias proteínas. Las colicinas que se liberan de una célula se unen a receptores específicos en la superficie de células susceptibles. Los receptores de las colicinas son, por lo general, entidades cuya función normal es transportar alguna sustancia, frecuentemente un factor de crecimiento o micronutriente, a través de la membrana externa (la capa de lipopolisacárido) de la célula. Las colicinas matan a las células alterando alguna función celular crítica. Muchas colicinas forman canales en la membrana celular que permiten la salida de iones potasio y de protones, originando en la célula una pérdida de su capacidad de obtener energía. Sin embargo, la colicina E2 es una endonucleasa que puede cortar el DNA celular, y la colicina E3 es una colicina que corta el RNA ribosomal 16S en un sitio específico e inactiva los ribosomas. Los plásmidos Col pueden ser conjugativos o no conjugativos.

Las bacteriocinas o agentes similares de las bacterias Gram positivas son bastante diferentes de las colicinas, pero, a menudo, están codificadas en plásmidos y algunas tienen incluso valor comercial. Por ejemplo, las bacterias del ácido láctico producen la bacteriocina Nisina A, que inhibe fuertemente el crecimiento de un amplio espectro de bacterias Gram positivas y se usa como conservante en la industria alimentaria.

Plásmidos de diseño

Las técnicas de ingeniería genética, comentadas más adelante en este capítulo, han hecho posible la construcción en el laboratorio de un número ilimitado de nuevos plásmidos artificiales. La incorporación de genes de una amplia variedad de orígenes en plásmidos artificiales ha permitido la transferencia de material genético, venciendo prácticamente cualquier barrera de especie. Resulta posible incluso sintetizar genes completamente nuevos e introducirlos en plásmidos.

Volvamos ahora de nuevo nuestra atención a los detalles de la conjugación para observar cómo algunos plásmidos pueden actuar movilizando el cromosoma bacteriano, permitiendo así la transferencia de genes desde un donador a un receptor.

✓ 10.8 Revisión de conceptos

La información genética que llevan los plásmidos no es esencial para la célula en todas las condiciones, pero puede representar una ventaja selectiva para el crecimiento bajo ciertas condiciones. Los ejemplos incluyen la resistencia a los antibióticos, enzimas para la degradación de compuestos orgánicos, y rutas metabólicas especiales. Los plásmidos estrechamente relacionados no se pueden replicar en la misma célula. Algunos plásmidos se transfieren de célula a célula por un mecanismo llamado conjugación.

- ✓ ¿Qué es más probable, que dos plásmidos incompatibles sean muy similares o muy diferentes?
- ✓ Los plásmidos conjugativos suelen ser grandes. ¿Por qué?

10.9 Conjugación y movilización del cromosoma

La conjugación bacteriana (apareamiento) es un proceso de transferencia genética que requiere contacto célula a célula. Como se comentó previamente (*véase* Sección 10.8), la conjugación es un mecanismo que está codificado en un plásmido. Un plásmido conjugativo usa este mecanismo para transferir una copia de sí mismo al nuevo hospedador. Sin embargo, otros elementos genéticos resultan a veces *movilizados* durante la conjugación. Éstos pueden ser otros plásmidos o el cromosoma del hospedador. De hecho, la conjugación se descubrió porque el plásmido F de *Escherichia coli* (*véase* Figura 10.17) puede movilizar el cromosoma del hospedador. Los mecanismos de transferencia por conjugación pueden ser diferentes dependiendo del plásmido concreto, pero la mayoría de los plásmidos de *Bacteria* Gram negativas parecen emplear un mecanismo similar al usado por el plásmido F.

La conjugación requiere una célula *donadora*, que contiene un tipo particular de plásmido conjugativo, y una célula *receptora* que carece de él. Dado que la conjugación se descubrió realizando cruces genéticos, las células donadoras se llamaron *machos* y las receptoras *hembras*. Los genes que controlan la conjugación están situados en la región *tra* del plásmido (*véase* Sección 10.8). Muchos genes de la región *tra* están relacionados con la síntesis de una estructura superficial, el **pelo sexual** (Figura 10.20). Sólo las células donadoras tienen estos pelos, lo que explica la razón por la que los bacteriófagos RNA que se unen a ellos se llaman «*específicos de machos*» (*véase* Sección 16.1). Plásmidos conjugativos diferentes pueden tener regiones *tra* diferentes, y, en algunos casos, los pelos pueden ser también distintos. El plásmido F y otros relacionados codifican *pelos F*.

Los pelos permiten el apareamiento específico entre la célula donadora y la receptora. En *Bacteria* Gram negativas, se cree que toda conjugación depende del apareamiento ocasionado por los pelos sexuales. Estos pelos establecen contactos específicos con un receptor de la otra célula y luego se retraen, empujando una célula hacia la otra. Luego, los contactos entre las células donadora y receptora se estabilizan, probablemente por fusión de las membranas externas, y el DNA se transfiere de una célula a otra.

Mecanismo de la transferencia de DNA durante la conjugación

La transferencia de DNA requiere síntesis de DNA, y la evidencia sugiere que una de las bandas deriva de la célula donadora y la otra se sintetiza de nuevo en el receptor durante el proceso de transferencia. Algunos genes de la región *tra* están implicados en la transferencia y replicación del DNA. En las Figuras 9.20 y 16.4, se presentó un mecanismo de síntesis de DNA de algunos bacteriófagos llamado **replicación por círculo rodante**. Este modelo es el que mejor explica la transferencia de DNA durante la conjugación, y un posible mecanismo de este proceso se esquematiza en la Figura 10.21. Todo el proceso parece ponerse en marcha tras el contacto célula a célula, en cuyo momento se rompe una cadena del

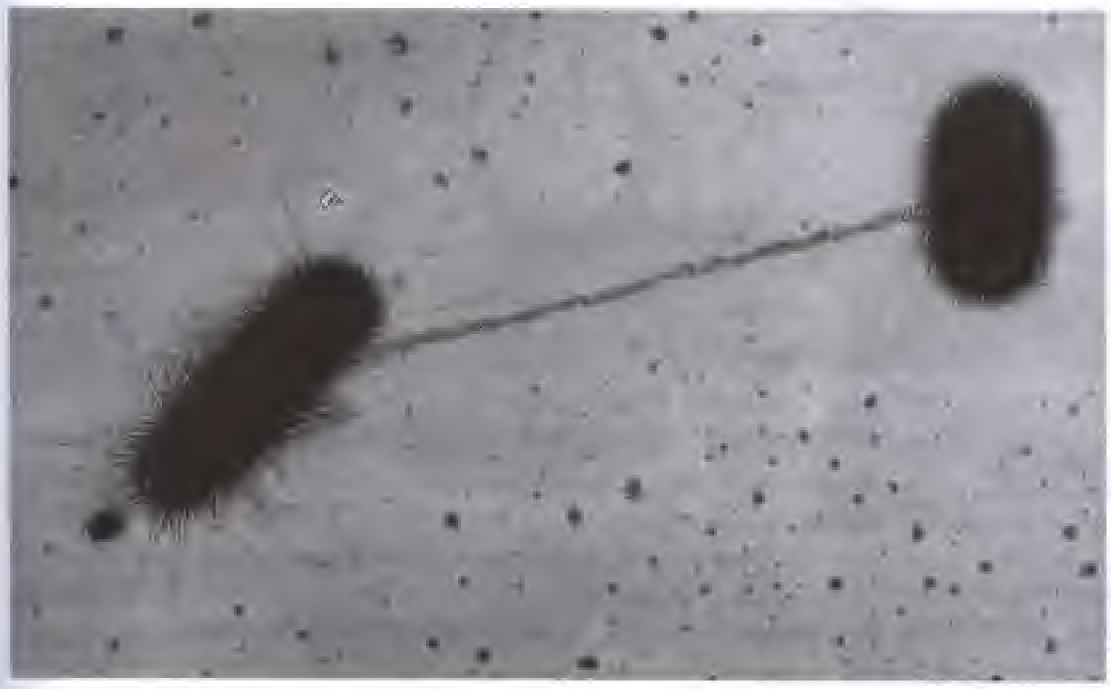

C. Brinton

Figura 10.20 El contacto directo entre dos bacterias que van a conjugar se establece primeramente a través de un pelo sexual. Las células se juntan luego para efectuar la transferencia del DNA. Esto tiene lugar por retracción (despolimerización) del pelo sexual en la célula donadora. Nótese la presencia de bacteriófagos específicos de F sobre el pelo (véase Sección 16.1).

DNA circular del plásmido y se transfiere una banda parental. La enzima responsable del corte necesario para iniciar el proceso, TraI, está codificada por el operón *tra* del plásmido F. Esta proteína tiene también una actividad helicasa y, por tanto, está implicada en el desenrollamiento de la banda que se va a transferir. A medida que ocurre la transferencia, la síntesis de DNA según el modelo del círculo rodante, reemplaza a la banda transferida en el donador. A su vez, una banda complementaria se sintetiza también en el receptor. Por tanto, al final del proceso, tanto el donador como el receptor poseen plásmidos completamente formados.

La transferencia del DNA plasmídico es extremadamente eficiente; bajo condiciones apropiadas prácticamente cada célula receptora que se aparea adquiere un plásmido. Cuando los genes del plásmido se expresan en el receptor, el propio receptor se convierte en donador y puede transferir el plásmido a otros receptores. De este modo, los plásmidos conjugativos se extienden rápidamente entre las poblaciones, comportándose como agentes infecciosos. La naturaleza infecciosa de este fenómeno tiene gran importancia ecológica, puesto que la introducción de algunas células con plásmidos, en una población adecuada de receptores, convierte a toda la población receptora en portadora del plásmido en poco tiempo, siempre que el plásmido contenga genes que confieran alguna ventaja selectiva. La amplia distribución de la resistencia a drogas debida a plásmidos conjugativos (*véase* Sección 10.8) ha ocasionado serios problemas a la quimioterapia de las enfermedades infecciosas (*véase* Sección 20.12). Sin embargo, como se mencionó antes, los plásmidos también pueden perderse por un proceso llamado *curación*. Esto puede ocurrir en poblaciones naturales donde no existe presión selectiva para mantener el plásmido. Por ejemplo, los plásmidos que confieren resistencia a antibióticos pueden perderse sin que esto afecte a la viabilidad celular si no hay antibióticos en el ambiente de la célula.

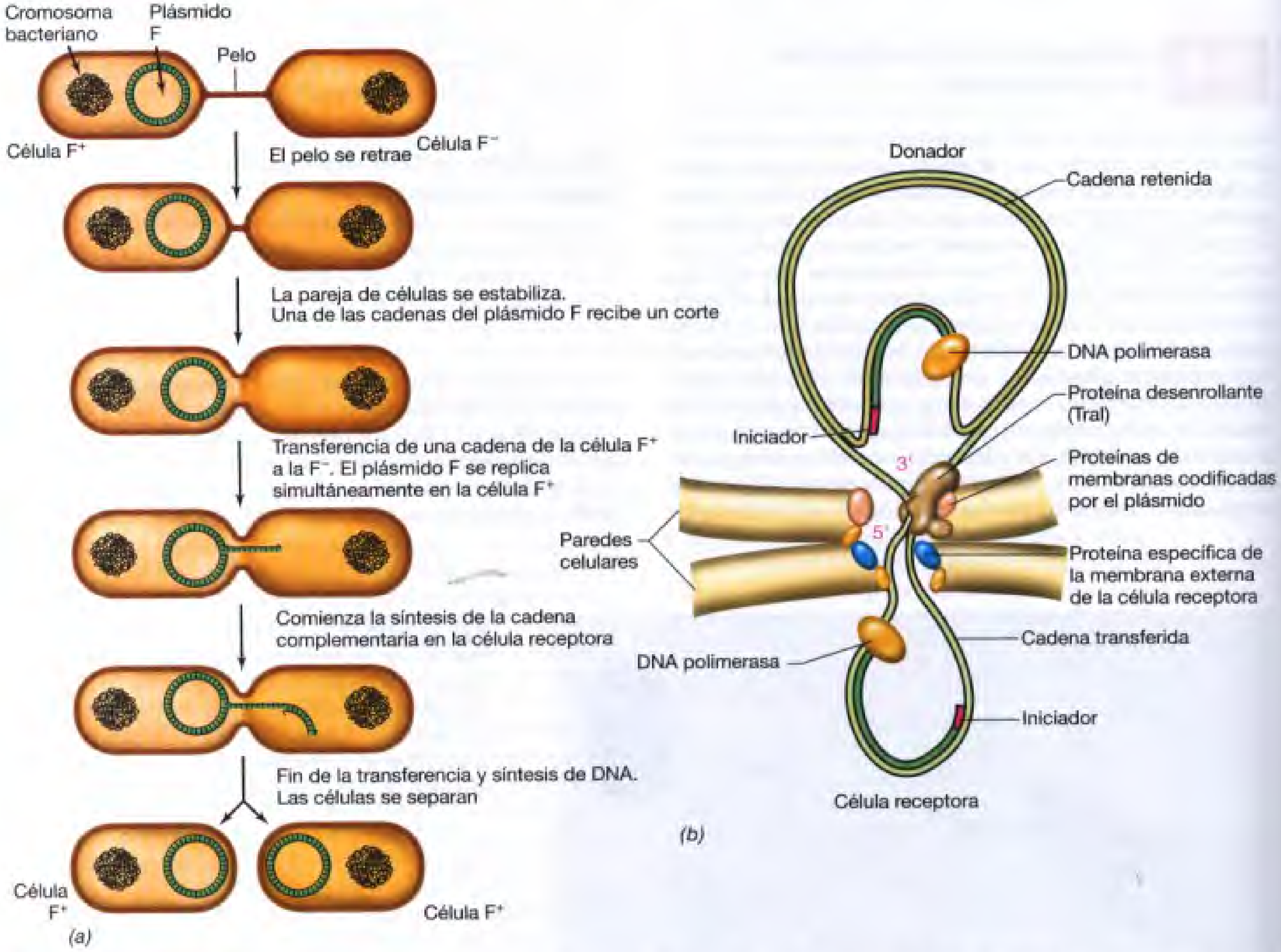

Cromosoma bacteriano
Plásmido F
Pelo
Célula F⁺
Célula F⁻
El pelo se retrae
La pareja de células se estabiliza.
Una de las cadenas del plásmido F recibe un corte
Transferencia de una cadena de la célula F⁺ a la F⁻. El plásmido F se replica simultáneamente en la célula F⁺
Comienza la síntesis de la cadena complementaria en la célula receptora
Fin de la transferencia y síntesis de DNA.
Las células se separan
Célula F⁺
Célula F⁺
(a)
Donador
Cadena retenida
DNA polimerasa
Proteína desenrollante (TraI)
Iniciador
3'
5'
Proteínas de membranas codificadas por el plásmido
Paredes celulares
Proteína específica de la membrana externa de la célula receptora
Cadena transferida
DNA polimerasa
Iniciador
Célula receptora
(b)

Figura 10.21 Transferencia de DNA plasmídico por conjugación. (a) En este ejemplo, el plásmido F de una célula F$^+$ se transfiere a una célula receptora F$^-$. Obsérvese el mecanismo replicativo del círculo rodante (*véanse* Figuras 9.20 y 16.4). (b) Detalles de la replicación y proceso de transferencia.

La formación de cepas Hfr y movilización del cromosoma

El plásmido F de *Escherichia coli* (*véase* Sección 10.8) no sólo es conjugativo sino que tiene la propiedad de movilizar el cromosoma de modo que pueda ser transferido durante el contacto célula a célula. El plásmido F es un episoma, es decir, un plásmido que puede integrarse en el cromosoma del hospedador (*véase* Sección 10.8). Cuando el plásmido F se integra en el cromosoma, la conjugación puede ocasionar la transferencia de grandes regiones del cromosoma del hospedador y la recombinación genética entre el donador y el receptor puede ser muy extensa.

Las células que poseen un plásmido F no integrado se llaman **F^+**, y las que tienen un plásmido F integrado en el cromosoma se llaman **Hfr** (del inglés, *High frequency of recombination*, alta frecuencia de recombinación). Tanto las cepas F^+ como las Hfr actúan como donadores, pero la conjugación que usa un donador Hfr conduce a la transferencia del cromosoma del hospedador puesto que el plásmido forma parte del cromosoma. La integración del plásmido es un mecanismo muy simple para movilizar otros elementos genéticos. El término alta frecuencia de recombinación hace alusión a la recombinación genética entre el cromosoma del donador y el del receptor. Las células que carecen del plásmido F se llaman F^- y actúan como receptores. En general, las células que contienen un plásmido conjugativo son receptores muy pobres para el mismo plásmido o plásmidos relacionados. Esto es debido a que se bloquea la entrada del plásmido, y no a incompatibilidades en el proceso de replicación (*véase* Sección 10.8).

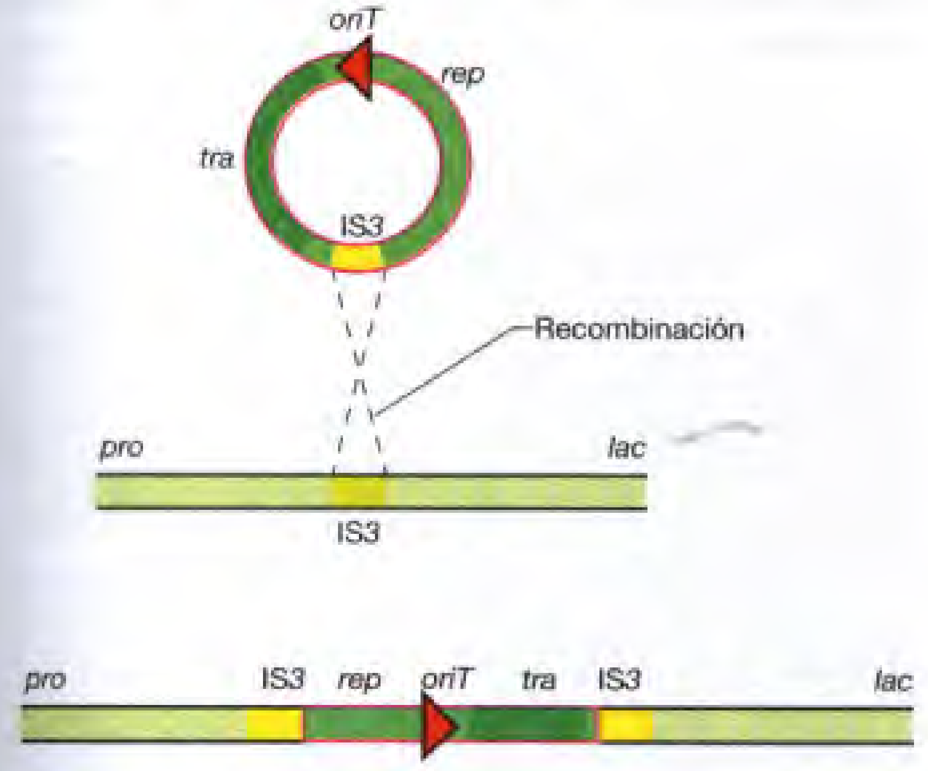


Figura 10.22 Integración de un plásmido F en el cromosoma originando un Hfr. La inserción del plásmido F ocurre en una variedad de sitios específicos donde se localizan elementos IS, estando el IS3 indicado aquí entre los genes cromosómicos *pro* y *lac*. Se muestran algunos de los genes del plásmido F. La flecha indica el origen de transferencia, *oriT*, con la flecha como extremo conductor. Así, en este Hfr *pro* sería el primer gen cromosómico transferido y *lac* estaría entre los últimos.

Por tanto, la presencia del plásmido F origina tres alteraciones distintas en las propiedades de una célula: (1) capacidad para sintetizar el pelo F, (2) movilización del DNA para su transferencia a otra célula, y (3) alteración de receptores de superficie de manera que la célula ya no es capaz de comportarse como receptora en la conjugación.

La integración del plásmido F en el cromosoma del hospedador puede tener lugar en varios sitios específicos llamados *secuencias de inserción* o IS (del inglés, *insertion sequences*). Estos sitios son regiones de homología entre el cromosoma y el DNA del plásmido F (*véase* Sección 10.11, para una discusión sobre las secuencias de inserción). La Figura 10.22 muestra cómo la integración de un plásmido F, implica la inserción en uno de estos sitios en el cromosoma. En el Hfr particular mostrado, el sitio de integración está entre los genes cromosómicos *pro* y *lac*. Una vez integrado, el plásmido ya no controla su propia replicación, pero la región *tra* aún funciona normalmente y la cepa sintetiza pelos. Cuando encuentra un receptor, se dispara el proceso de conjugación como si fuera una célula F^+, y se inicia la transferencia de DNA en *oriT* (origen de la transferencia). Sin embargo, puesto que el plásmido es ahora parte del cromosoma, tras la transferencia de parte del plásmido comienzan a transferirse genes cromosómicos (Figura 10.23). (Del mismo modo que ocurría con el plásmido F, la transferencia de DNA requiere replicación, de manera que, una vez terminada la transferencia, la cepa

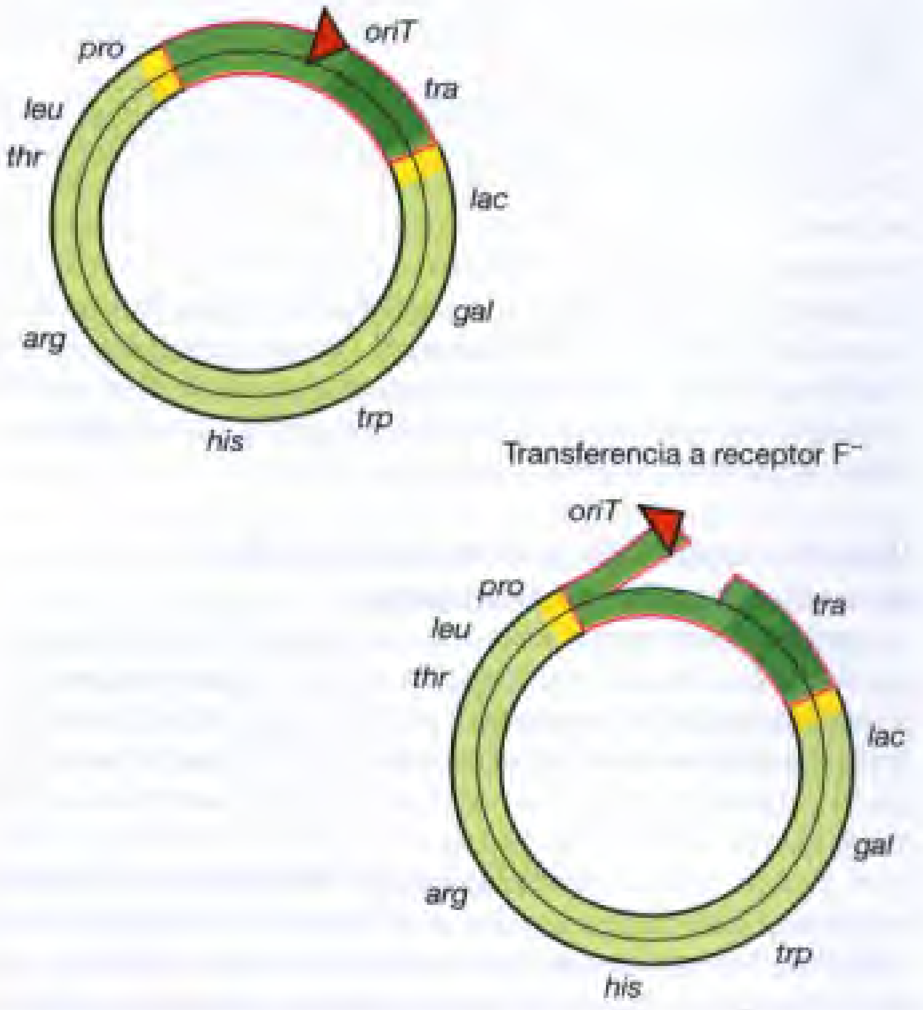


Figura 10.23 Rotura del cromosoma Hfr en el origen de transferencia e iniciación de la transferencia del DNA al receptor. Durante la transferencia tiene lugar la replicación (*véase* Figura 10.21). Obsérvese que la figura no está dibujada a escala. El plásmido F insertado es menos del 3% del tamaño del cromosoma de *Escherichia coli*.

Hfr permanece Hfr ya que ha retenido una copia del material genético transferido.)

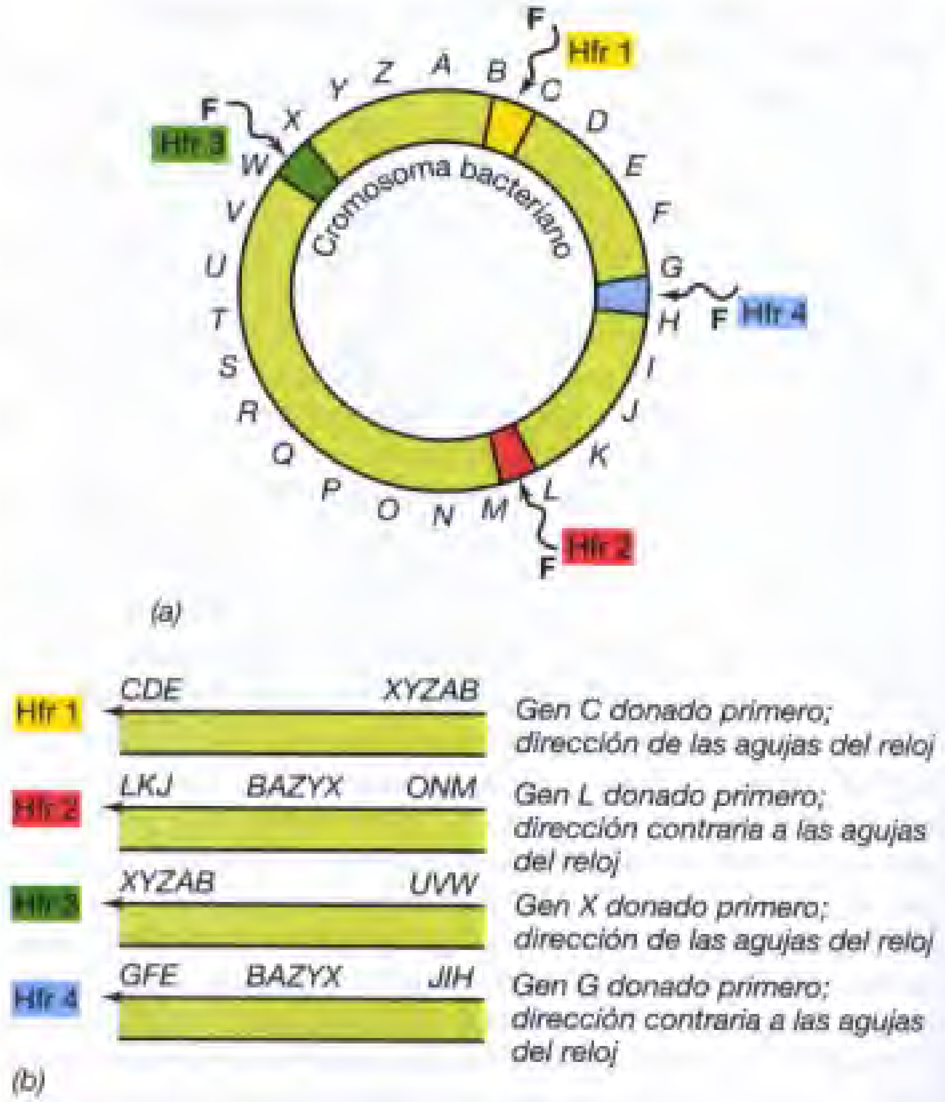
Así, decimos que se *moviliza* el cromosoma. Como hemos mencionado, la integración de un plásmido es un mecanismo simple de movilización. Se conocen otros mecanismos de movilización, que implican no sólo al cromosoma bacteriano sino también a otros plásmidos. Uno de estos mecanismos opera si el plásmido a movilizar contiene una secuencia *oriT* similar a la encontrada en el plásmido F. Tal plásmido será transferido por conjugación si coexiste en una célula con un plásmido conjugativo que pueda suministrar el resto de los genes necesarios.

Puesto que existen varios sitios de inserción diferentes, son posibles varias cepas Hfr distintas. Una determinada cepa Hfr siempre dona los genes en el mismo orden, comenzando en la misma posición, pero cepas Hfr de origen independiente transfieren los genes en secuencias diferentes.

Generalmente, debido a la rotura de la cadena de DNA durante la transferencia, sólo se transfiere *parte* del cromosoma donador. A causa de ello, esa parte no puede replicarse por sí misma en la célula receptora. Por consiguiente, los genes del receptor no se detectan a menos que ocurra recombinación entre el fragmento que ha entrado y el cromosoma del receptor.

Aunque las cepas Hfr transmiten con elevada frecuencia genes cromosómicos, por lo general, no convierten las células F^- a F^+, ya que raramente se transfiere el plásmido F completo. Por otra parte, las células F^+ convierten con eficacia, las células F^- a F^+ porque se transfiere el plásmido entero.

En algunos sitios de inserción, el plásmido F se integra con el origen en una dirección, mientras que en otros sitios el origen está en dirección opuesta. La dirección en la que se inserta el plásmido F determina cuáles son los genes cromosómicos que se transferirán al receptor en primer lugar. La manera en que surge una variedad de cepas Hfr se ilustra en la Figura 10.24. Mediante el uso de varias cepas Hfr ha sido posible determinar en *Escherichia coli* la disposición y orientación de un gran número de genes cromosómicos, como se describirá en la Sección 10.19.



Gen C donado primero; dirección de las agujas del reloj

Gen L donado primero; dirección contraria a las agujas del reloj

Gen X donado primero; dirección de las agujas del reloj

Gen G donado primero; dirección contraria a las agujas del reloj

Figura 10.24 Formación de diferentes cepas Hfr, que donan genes en orden diferente y a partir de diferente origen. El cromosoma bacteriano es un círculo (a) que puede abrirse en varias secuencias de inserción en las que se han fijado plásmidos F. En (b), se muestra el orden de los genes.

Uso de cepas Hfr y el fenómeno de la conjugación interrumpida

Al igual que en otros sistemas de transferencia de genes en bacterias, tras la conjugación deben **seleccionarse** los recombinantes. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en la transformación y la transducción, durante la conjugación, tanto el donador como el receptor son viables, de manera que se hace necesario escoger un medio de selección donde puedan crecer los recombinantes deseados, pero en el que ni el donador ni el receptor puedan formar colonias. Normalmente, se usa un receptor resistente a un antibiótico paro auxotrofo para alguna sustancia, y un donador que es sensible al antibiótico pero es prototrófico para la misma sustancia.

Por ejemplo, en el experimento mostrado en la Figura 10.25, un donador Hfr que es sensible a estreptomicina (Str^s) y contiene genes silvetres que codifican las enzimas necesarias para la síntesis de los aminoácidos treonina y leucina (Thr^+ y Leu^+) y para la utilización de la fuente de energía lactosa (Lac^+), se aparea con una célula receptora que es mutante para estos genes pero resistente a estreptomicina (Str^r). El medio selectivo es un medio mínimo que contiene estreptomicina de modo que sólo los recombinantes pueden crecer. Como se muestra en la Figura 10.25, la composición de cada medio selectivo varía dependiendo de las características genotípicas de los recombinantes deseados. La frecuencia del proceso se mide contando las colonias que crecen en el medio selectivo.

La comprensión del mecanismo de la conjugación y el conocimiento de que una cepa Hfr es una célula con un plásmido F integrado en el cromosoma, es esencial para comprender que, en una cepa dada Hfr, la transferencia de los genes cromosómicos ocurrirá siempre en el mismo orden y desde un sitio determinado. La naturaleza orientada y fragmentaria de la transferencia de genes, se descubrió en un procedimiento denominado **conjugación interrumpida**. Los pares de células conjugadas se mantienen unidos débilmente y pueden separarse por agitación en una «coctelera». Si se agitan mezclas de células Hfr y F^- a distintos tiempos tras la mezcla y se buscan recombinantes, se concluye que cuanto mayor es el tiempo que transcurre entre el apareamiento y la agitación, mayor es el número de ge-

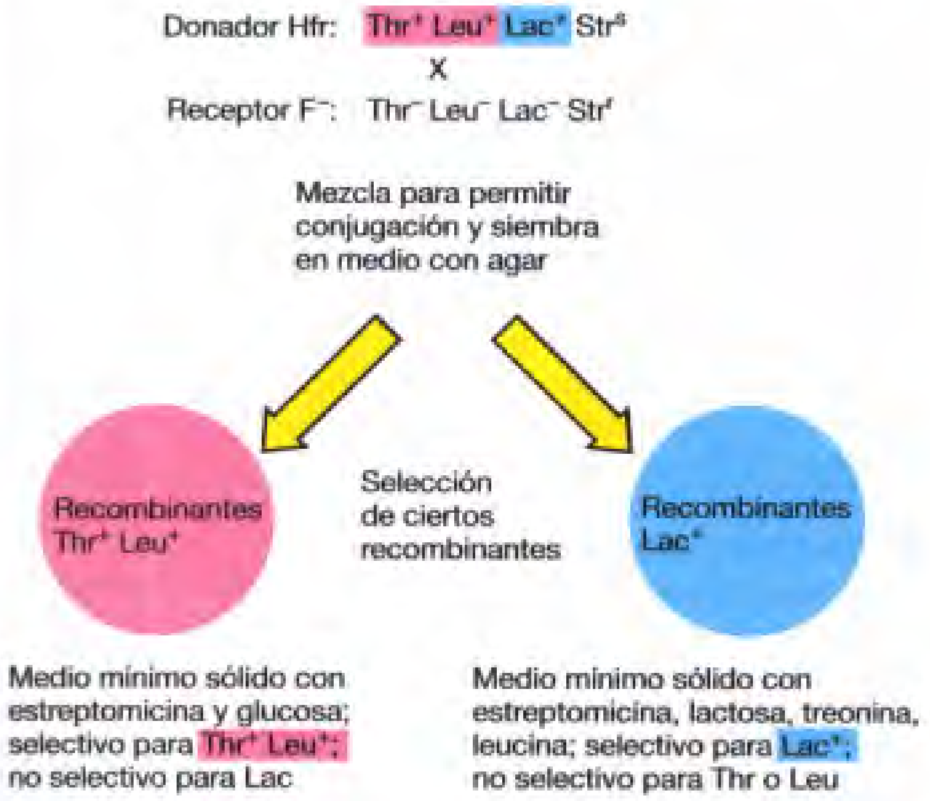

Donador Hfr: Thr$^+$ Leu$^+$ Lac$^+$ Str^S
X
Receptor F$^-$: Thr$^-$ Leu$^-$ Lac$^-$ Str^r
Mezcla para permitir conjugación y siembra en medio con agar
Recombinantes Thr$^+$ Leu$^+$
Selección de ciertos recombinantes
Recombinantes Lac$^+$
Medio mínimo sólido con estreptomicina y glucosa; selectivo para Thr$^+$ Leu$^+$; no selectivo para Lac
Medio mínimo sólido con estreptomicina, lactosa, treonina, leucina; selectivo para Lac$^+$; no selectivo para Thr o Leu

Figura 10.25 Procedimiento para la detección en el laboratorio de la conjugación genética. Thr, treonina; Leu, leucina; Lac, lactosa; Str, estreptomicina. Obsérvese que cada medio selecciona clases específicas de recombinantes. Los controles del experimento consisten en sembrar muestras del donador y del receptor antes de mezclarse. Ninguno de ellos debería crecer sobre el medio selectivo usado.

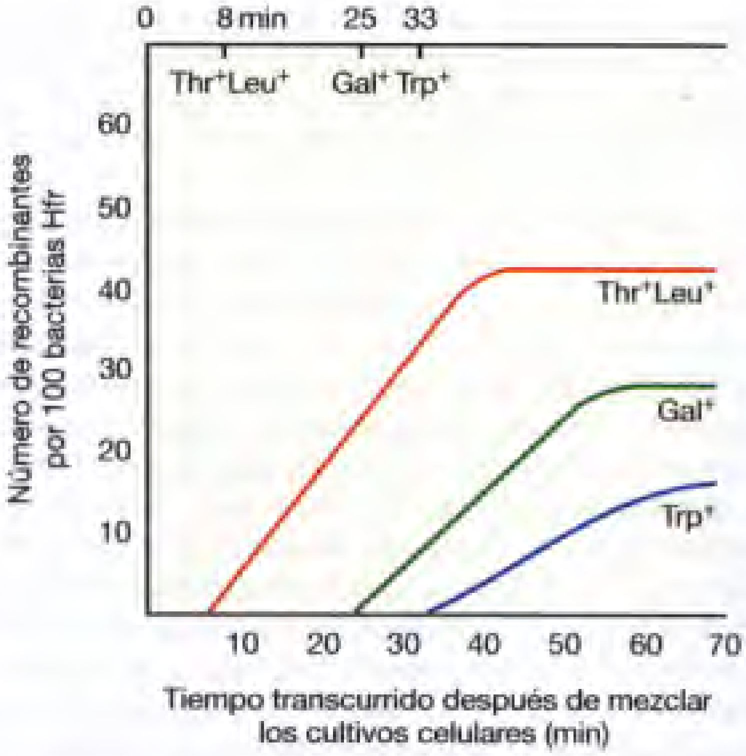


Figura 10.26 Velocidad de formación de recombinantes conteniendo diferentes genes tras mezclar bacterias Hfr y F$^-$ según el procedimiento de conjugación interrumpida. La localización de los genes en el cromosoma Hfr se muestra en la parte superior izquierda. Obsérvese que los genes más cercanos al origen (0 min) son los primeros detectados en los recombinantes. El experimento se hace mezclando células Hfr y F$^-$ bajo condiciones en las que prácticamente todas las células Hfr encuentran pareja. Las células receptoras F$^-$ eran resistentes a la estreptomicina pero auxotrofas para los marcadores estudiados. La cepa Hfr donadora era sensible a la estreptomicina. A diferentes tiempos, se agitaban vigorosamente muestras de la mezcla a fin de separar las células conjugadas y se sembraba sobre un medio selectivo en el que sólo podían crecer y formar colonias los recombinantes.

nes del Hfr que aparecerán en el F$^-$ recombinante. Como se indica en la Figura 10.26, los genes más cercanos al origen entran primero en la F$^-$ y están siempre presentes en un mayor porcentaje de recombinantes que los genes que entran más tarde. Además de demostrar que la transferencia de genes es un proceso secuencial, este tipo de experimentos suministra un método para determinar el orden de los genes en el DNA bacteriano (mapeo genético). La disposición de los distintos *loci* genéticos en el cromosoma se denomina **mapa genético** (*véase* Sección 10.19).

Al igual que en la transformación y transducción, la recombinación genética entre genes Hfr y genes F$^-$ implica recombinación homóloga en la cepa receptora. Esto se ha demostrado mediante el aislamiento de mutantes de cepas F$^-$ que son incapaces de formar recombinantes cuando se aparean con Hfr. Estos mutantes son Rec$^-$ (recombinación menos) y son deficientes en la proteína RecA debido a una mutación en el gen *recA* (*véase* Sección 10.5). Es importante recordar que no es lo mismo recombinación que transferencia de DNA. La transferencia de DNA no está afectada por el hecho de que el receptor sea Rec$^-$, incluso a pesar de que no ocurra recombinación tras la transferencia.

Transferencia de genes cromosómicos al plásmido F

Ocasionalmente, los plásmidos F integrados se pueden escindir del cromosoma, y existe la posibilidad de que en el proceso se incorporen genes *cromosómicos* en el plásmido F liberado. Esto puede ocurrir porque tanto el plásmido F integrado como el cromosoma contienen varios sitios IS idénticos donde puede ocurrir la recombinación. Los plásmidos F que contienen genes cromosómicos se llaman *plásmidos* F′ (F *prima*). Estos plásmidos F′ difieren de los plásmidos F normales en que contienen genes cromosómicos identificables y los transfieren a receptores con una frecuencia muy alta. La transferencia mediada por F′ recuerda a la transducción especializada en el sentido de que sólo se transfiere un grupo restringido de genes cromosómicos. La transferencia de un F′ conocido a un receptor permite la formación de diploides en una región limitada del cromosoma (tales diploides parciales se llaman *merodiploides*). Esto es importante para llevar a cabo pruebas de complementación (*véase* Sección 10.10).

Otros sistemas de conjugación

Aunque hemos comentado la conjugación tal y como ocurre en *Escherichia coli* casi exclusivamente, se han encontrado plásmidos conjugativos en muchas otras *Bacteria* Gram negativas. De hecho, pueden mantenerse plásmidos conjugativos del grupo de incompatibilidad IncP (*véase* Sección 10.8) en prácticamente todas las especies de Gram negativas, y puede ocurrir transferencia de DNA entre especies y géneros. También se conocen plásmidos en *Bacteria* Gram positivas (por ejemplo, en *Streptococcus*, *Enterococcus* y

Staphylococcus). En general, el mecanismo de conjugación en otras Bacteria Gram negativas es muy similar al que hemos descrito para el plásmido F, mientras que la conjugación entre *Bacteria* Gram positivas puede ser bastante diferente.

Algunos plásmidos conjugativos movilizan otros elementos genéticos, como hemos visto en el caso del plásmido F, pero éste no es siempre el caso. Existen elementos llamados *transposones conjugativos* que pueden transferirse a sí mismos desde el cromosoma de un donador al de un receptor y también pueden movilizar otros elementos genéticos. Los transposones conjugativos se han encontrado principalmente en *Bacteria* Gram positivas. Tienen un amplio espectro de hospedadores y pueden estar implicados en la transferencia de genes entre bacterias de diferentes géneros. El mecanismo de conjugación usado por estos elementos no se conoce por completo, pero parece requerir la formación de intermediarios circulares semejantes a plásmidos. Se han encontrado plásmidos conjugativos en *Sulfolobus*, un género de *Archaea*. Se conoce muy poco de la conjugación en *Sulfolobus*, aunque se sabe que tiene lugar apareamiento célula a célula antes de la transferencia del plásmido y que la transferencia es unidireccional. Sin embargo, con una excepción, los genes implicados parecen tener poca similitud con sus correspondientes *Bacteria* Gram negativas. La excepción es un gen similar a *traG*, cuyo producto proteico parece estar implicado en la estabilización de parejas acopladas en la conjugación mediada por el plásmido F. Parece pues, que el mecanismo de la conjugación en *Archaea* es bastante diferente del de *Bacteria*.

✓ 10.9 Revisión de conceptos

La conjugación es un mecanismo de transferencia de DNA en procariotas que requiere contacto célula a célula. La conjugación está controlada por genes localizados en ciertos plásmidos (tales como el plásmido F) y, generalmente consiste en la transferencia del plásmido desde una célula donadora a una receptora. Sin embargo, a veces se pueden movilizar y transferir otros elementos genéticos, incluido el cromosoma de la célula donadora. La transferencia del cromosoma del hospedador es rara vez completa pero puede utilizarse para mapear el orden de los genes en el cromosoma.

✓ ¿Cómo entran en contacto entre sí la célula donadora y la receptora?

✓ En la conjugación, en la que está implicado el plásmido F de *Escherichia coli*, ¿cómo se moviliza el cromosoma del hospedador?

10.10 Complementación

Los métodos de transferencia de genes en bacterias comentado en las secciones precedentes implican la transferencia de sólo una *porción* del cromosoma donador. Por tanto, a menos que ocurra recombinación con el cromosoma receptor, el DNA del donador que entra en la célula se perderá ya que no puede replicarse independientemente. Tan sólo en dos casos hemos visto que puede mantenerse un estado de diploidía parcial. Uno era el caso de la transducción especializada, en la que los genes del donador se mantienen como parte del genoma viral (*véase* Sección 10.7). El otro fue el uso de plásmidos F′, en donde los genes del donador se han incorporado al genoma del plásmido F (*véase* Sección 10.9). Puesto que es posible crear un fago transductor especializado o plásmidos recombinantes mediante técnicas de DNA recombinante (*véanse* Secciones 10.15 y 10.16), resulta ahora posible poner esencialmente cualquier porción del cromosoma bacteriano en un fago o plásmido. Esto puede ser bastante útil para diferentes propósitos, siendo uno de ellos el *test de complementación*.

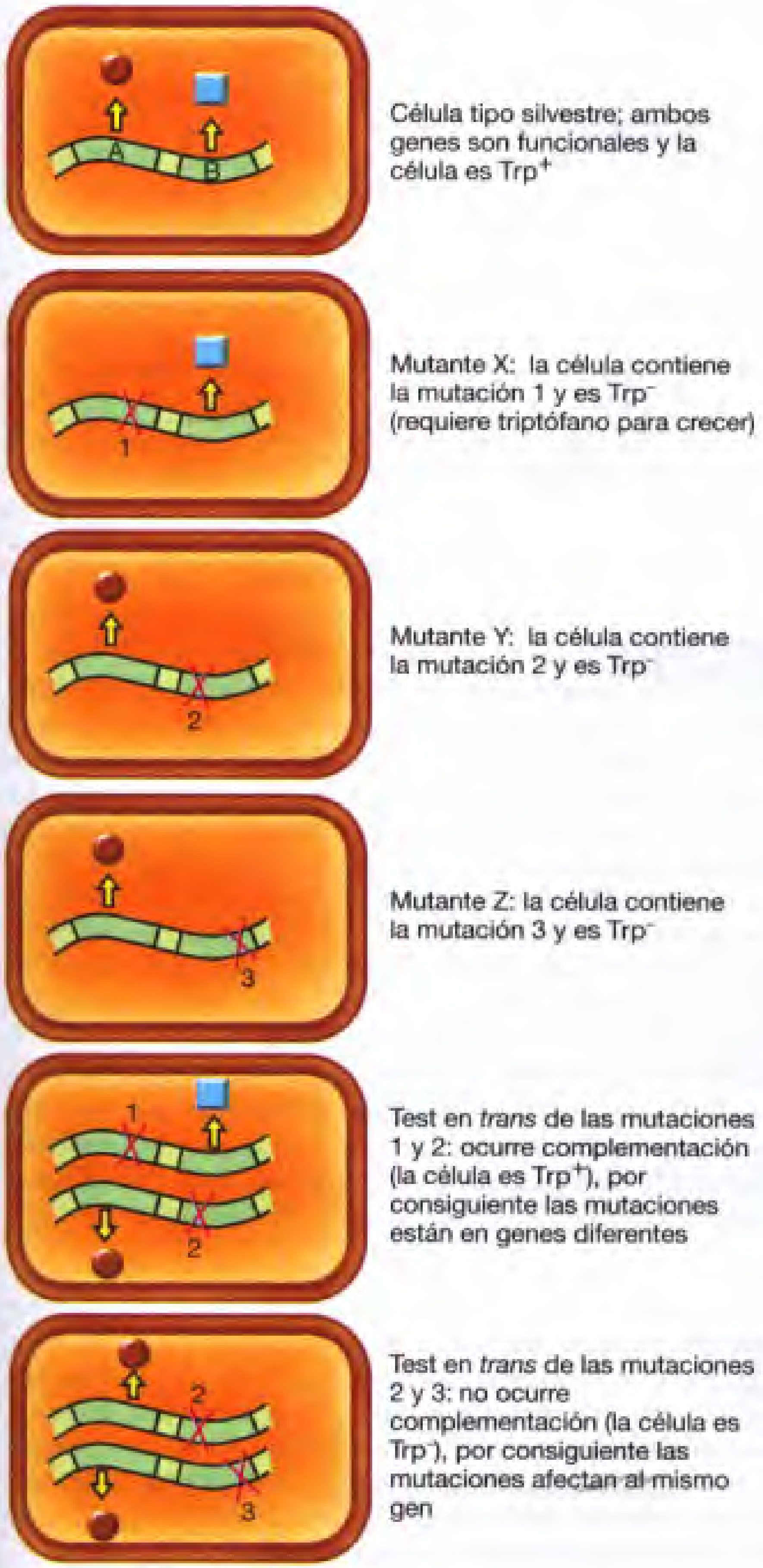
El test de complementación

Cuando se cruzan genéticamente dos cepas mutantes (se conjugan), la recombinación homóloga puede generar recombinantes del tipo silvestre a menos que ambas mutaciones incluyan cambios en los mismos pares de bases. Así, si dos cepas Trp$^-$ de *Escherichia coli* (que requieren el aminoácido Trp en el medio) se cruzan y se obtienen recombinantes Trp$^+$, resulta claro que las mutaciones no afectan a los mismos pares de bases. Sin embargo, este experimento no puede detectar si las mutaciones están en el mismo gen. Esto puede determinarse mediante un test llamado **prueba** o **test de complementación**.

La complementación se usó inicialmente en organismos eucarióticos *diploides*. En los organismos diploides la célula tiene *pares* de cromosomas, cada miembro procedente de un padre (*véase* Sección 14.6). Cuando dos mutaciones están presentes en miembros separados de un par (es decir, una mutación de cada padre), se dice que están en configuración **trans**. Por otro lado, si las dos mutaciones están en el *mismo* cromosoma se dice que están en configuración **cis**. Como hemos comentado, en procariotas no existen verdaderos diploides, pero se puede conseguir un estado diploide para una región del cromosoma por transferencia de un fragmento cromosómico de un donador. Sin embargo, el principio de la prueba y la nomenclatura (*cis* y *trans*) es la misma.

Si uno de los genes del triptófano se inactiva en una célula por una mutación, originando un fenotipo Trp$^-$, la introducción de una copia del gen silvestre de otra cepa en dicha célula debería restaurar el fenotipo silvestre de la misma; es decir, el diploide parcial resultante debe ser Trp$^+$ (esto es cierto a menos que la mutación sea *dominante*). Entonces, se puede decir que el gen silvestre *complementa* la mutación.

Incluso aunque en procariotas sólo se transfiere un fragmento cromosómico, este fragmento es por lo general suficientemente grande como para contener varios genes. Recuérdese que los genes para la biosíntesis del triptófano forman un operón (*véase* Figura 8.20), y, por tanto, se puede transferir el operón entero desde la célula donadora. Nótese que entonces, incluso si el operón del donador también tiene una mutación, complementará al gen mutado en el receptor *si las dos mutaciones están en genes diferentes*. Se dice que las dos mutaciones se *complementan*. Esto se muestra en el diagrama de la Figura 10.27. Las mutaciones pueden complementar porque los genes codifican proteínas que pueden difundir dentro del citoplasma de la célula. (No se



Célula tipo silvestre; ambos genes son funcionales y la célula es Trp$^+$

Mutante X: la célula contiene la mutación 1 y es Trp$^-$ (requiere triptófano para crecer)

Mutante Y: la célula contiene la mutación 2 y es Trp$^-$

Mutante Z: la célula contiene la mutación 3 y es Trp$^-$

Test en *trans* de las mutaciones 1 y 2: ocurre complementación (la célula es Trp$^+$), por consiguiente las mutaciones están en genes diferentes

Test en *trans* de las mutaciones 2 y 3: no ocurre complementación (la célula es Trp$^-$), por consiguiente las mutaciones afectan al mismo gen

Figura 10.27 Análisis por complementación. Los productos proteicos de ambos genes (A y B) son requeridos para sintetizar triptófano. Cada una de las mutaciones 1, 2 y 3 originan el mismo fenotipo, un requerimiento de triptófano. El análisis por complementación indica que las mutaciones 2 y 3 están en un gen, y que la mutación 1 está en otro.

pueden complementar mutaciones en sitios regulatorios tales como los promotores, ya que éstos funcionan a nivel de DNA.) Si cada molécula homóloga de DNA proporciona un gen diferente de los requeridos, entonces la célula tendrá todas las enzimas requeridas para sintetizar triptófano. Nótese que la complementación *no* implica recombinación. Para hacer el test, las mutaciones deben estar en *trans*. (Si una molécula lleva ambas mutaciones, la otra será del tipo silvestre y debería ser capaz por sí misma de conferir el fenotipo silvestre, a menos que una de las mutaciones sea *dominante*. Por tanto, disponer de las mutaciones en *cis* sirve de control.)

El cistrón

Este tipo de prueba de recombinación, llamada *test cis-trans* se usa para definir si dos mutaciones están en la misma unidad genética (funcional). La unidad genética definida por el test cis-trans se denomina a veces un **cistrón** (un término que es esencialmente equivalente al de gen). Como se ha mencionado, dos mutaciones en el *mismo* cistrón *no pueden* complementar, de modo que cuando se produce la complementación implica que las dos mutaciones se localizan en *diferentes* cistrones (esto es, en diferentes genes). El término *cistrón* se usa ahora raramente, excepto para describir si un mRNA tiene la información genética de un gen (mRNA monocistrónico) o de más de un gen (policistrónico) (*véase* Sección 7.11).

✓ 10.10 Revisión de conceptos

Si se puede conseguir que una célula contenga dos copias de una región de su genoma que estemos estudiando, se pueden hacer test de complementación para determinar si dos mutaciones están en el mismo gen o en genes diferentes. Esto es a menudo necesario porque mutaciones en diferentes genes de la misma ruta pueden originar el mismo fenotipo. Los tests de complementación no implican recombinación.

- ✓ ¿Qué es un *diploide parcial*?
- ✓ Las pruebas de complementación se conocen como *tests cis-trans*. Explíquelo.

10.11 Transposones y secuencias de inserción

El orden de los genes en un cromosoma bacteriano puede determinarse por los métodos de transferencia de genes que acabamos de considerar, así como los genes de los cromosomas de eucariotas pueden mapearse mediante experimentos de conjugación. Sin embargo, el orden exacto de los genes en un cromosoma no está permanentemente fijado de modo necesario; algunos genes pueden moverse bajo ciertas condiciones. El proceso por el que un gen se mueve de un sitio a otro se llama **transposición** y es un proceso importante en la evolución y en el análisis genético.

Es importante resaltar que la transposición, típicamente, es un acontecimiento *raro* que ocurre a frecuencias de $10^{-5}-10^{-7}$ por generación. Por tanto, los genes de los organismos vivos son relativamente estables.

Además, no todos los genes son capaces de transposición. Más bien, la transposición de los genes está unida a la presencia de elementos genéticos especiales llamados **elementos transponibles**.

La transposición se descubrió originalmente en el maíz y posteriormente en *Bacteria* debido al análisis genético extremadamente sensible que puede realizarse con estos organismos.

Se ha demostrado ahora que las secuencias de DNA con las propiedades de transposones se encuentran ampliamente extendidas en la naturaleza. Sin embargo, en organismos con sistemas genéticos poco caracterizados, puede resultar difícil detectar la existencia de transposición (porque es un acontecimiento raro) y demostrar que una secuencia es realmente un elemento transponible.

Elementos transponibles

Como hemos comentado (*véase* Sección 7.4), hay tres tipos de elementos genéticos transponibles en *Bacteria*: *secuencias de inserción*, *transposones* y algunos virus especiales (tal como Mu)(*véase* Sección 16.5). En esta sección limitaremos nuestra discusión esencialmente a las secuencias de inserción y a los transposones. Ambos elementos tienen dos importantes características en común: llevan genes que codifican para una **transposasa**, y tienen cortas *repeticiones terminales invertidas* en los extremos de su DNA (recuérdese que estos «extremos» son continuos con el DNA en el que se haya insertado el elemento). La longitud de estas repeticiones varía desde menos de 20 pares de bases en los elementos IS simples a más de 1000 pares de bases en algunos transposones; cada IS tiene un número específico de pares de bases en sus repeticiones terminales. Las repeticiones terminales invertidas están implicadas en el proceso de transposición (*véase* más adelante). La Figura 10.28 muestra un mapa genético de un elemento de inserción llamado IS2 y de un transposón llamado Tn*5*.

Las secuencias de inserción son el tipo más simple de elemento transponible y no llevan otra información genética que la requerida para desplazarse a nuevos lugares. Las secuencias de inserción son segmentos cortos de DNA, de unos 1000 nucleótidos de longitud, que pueden insertarse en sitios específicos del genoma. Las secuencias de inserción, abreviadamente IS, se encuentran tanto en el cromosoma como en el DNA plasmídico, así como en ciertos bacteriófagos. Se han caracterizado varios cientos de IS distintos, y la mayoría se designan por un número que identifica su tipo: IS*1*, IS*2*, IS*3*, ... y así sucesivamente. Debido al alto número de IS descubiertos, algunos reciben designaciones relacionadas con el organismo en el que fueron identificados por primera vez. Por ejemplo, IS Mt*1* viene de *Mycobacterium tuberculosis*. Los elementos IS están esparcidos por el cromosoma, y las cepas varían respecto al número y frecuencia de estos elementos. Por ejemplo, una cepa de *Escherichia coli* tiene cinco copias de IS2 y cinco copias de IS3. Muchos plásmidos también llevan estas secuencias de inserción (*véanse* Figuras 10.17 y 10.19), y es la recombinación homóloga entre secuencias idénticas en el plásmido F y en el cromosoma (*no* transposición), lo que facilita la integración del plásmido F en el cromosoma bacteriano y la movilización de este último (*véase* Sección 10.9). Algunas *Archaea* tienen gran número de elementos IS en sus cromosomas.

Los transposones son más largos que las secuencias de inserción y llevan otros genes, algunos de los cuales confieren propiedades importantes al organismo que los lleva. Éstos incluyen con frecuencia marcadores de resistencia a drogas y otros genes fácilmente seleccionables. Además, como hemos mencionado (*véase* Sección 10.9), hay *transposones conjugativos* que tienen genes que les permiten no sólo moverse de un sitio a otro del genoma bacteriano sino también transferirse de una bacteria a otra.

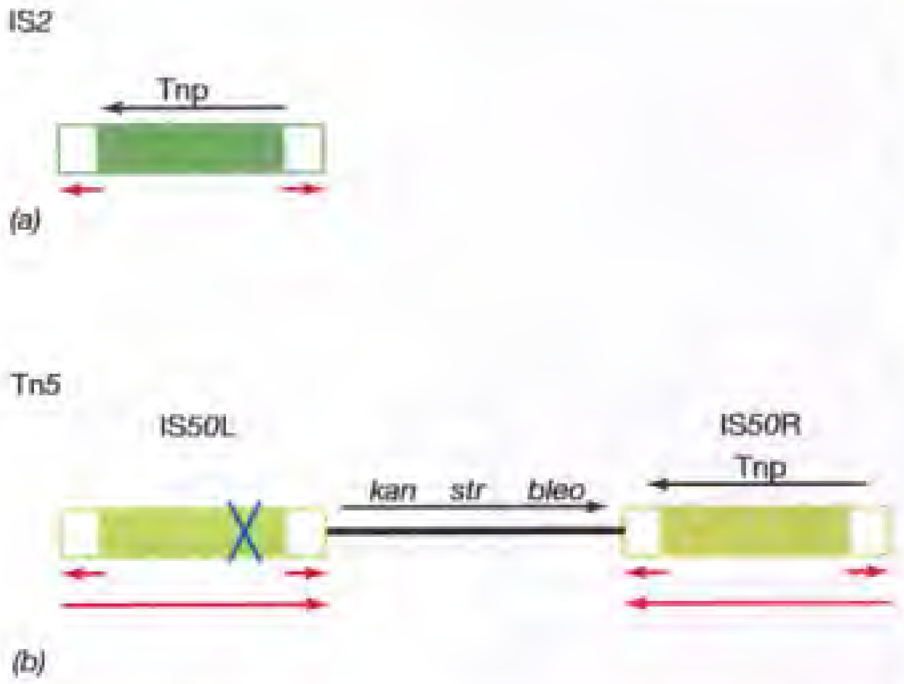


Figura 10.28 Mapas de los elementos transponibles IS2 y Tn5. La flecha roja bajo cada mapa indica las repeticiones invertidas. Las flechas sobre los mapas indican la dirección de la transcripción de los genes de los elementos. *Tnp* es el gen que codifica la transposasa. Los genes de estos dos elementos no están estrechamente relacionados. (a) IS2 es una secuencia de inserción de 1327 pares de bases con repeticiones invertidas de 41 pares de bases en sus extremos. (b) Tn5 es un transposón compuesto de 5700 pares de bases con las secuencias de inserción IS*50*L e IS*50*R en sus extremos izquierdo y derecho, respectivamente. IS*50*L es incapaz de efectuar transposición independiente porque tiene una *mutación sin sentido* (véase Sección 10.2) en su gen de la transposasa, marcada por una cruz azul en la figura. En otros aspectos, los dos elementos IS*50* son casi idénticos. Nótese que estos dos elementos IS*50* están invertidos uno respecto al otro. Los genes *kan*, *str* y *bleo*, confieren resistencia a los antibióticos kanamicina (y neomicina), estreptomicina y bleomicina. Curiosamente, la resistencia a la estreptomicina no se expresa en *Escherichia coli*.

Algunos transposones son, en realidad, estructuras compuestas que contienen un gen o grupo de genes entre dos secuencias de inserción idénticas. La existencia de estos *transposones compuestos* indica que es probable que en las células que poseen secuencias de inserción surjan continuamente nuevos transposones.

El mecanismo de transposición

Como se ha mencionado previamente, las repeticiones invertidas que se encuentran en los extremos de los elementos transponibles son esenciales para la transposición. El otro componente esencial es una enzima llamada *transposasa*, que reconoce estas repeticiones. Normalmente, esta enzima está codificada por el elemento transponible, aunque algunos elementos IS simples usan una enzima codificada por otro elemento genético. La transposasa aparentemente reconoce, corta y, eventualemente, liga el DNA durante la transposición (Figura 10.29).

Cuando un elemento transponible se inserta en otro DNA (DNA diana), se duplica una secuencia corta en el sitio de integración. Esta secuencia corta no estaba presente en el elemento, pero el elemento transponible ha ocasionado la duplicación de este DNA en el proceso mismo de inserción. La duplicación de la secuencia diana ocurre porque la transposasa genera cortes en una sola cadena. El transposón se une entonces a los extremos monocatenarios generados, y la reparación de las porciones monocatenarias da como resultado la duplicación (*véase* Figura 10.30).

Algunos elementos transponibles prefieren ciertas secuencias como dianas, pero otros, incluyendo el bacteriófago Mu, se pueden insertar prácticamente al azar (*véase* Figura 16.9 del Capítulo 16 para una representación de la inserción de Mu).

Se conocen dos mecanismos de transposición, los llamados *conservativo* y *replicativo* (Figura 10.30). En la transposición conservativa, como la que ocurre en el transposón Tn5, el elemento transponible se separa de una localización en el cromosoma y se reinserta en una segunda localización. El número de copias de un transposón conservativo, por lo tanto, no varía. En cambio, los transposones replicativos, como el bacteriófago Mu (*véase* Sección 16.5), se duplican, y la nueva copia se inserta en otra región. Por tanto, tras el proceso completo de transposición, *una* copia del elemento transponible permanece en el sitio original y la *otra copia* se encuentra en el sitio nuevo. Durante este proceso de transposición, el transposón original *permanece* en su sitio inicial y nunca se encuentra libre en la célula.

Aunque se desconocen muchos de los detalles moleculares de la transposición, y elementos transponibles distintos parecen tener diferentes mecanismos, en la Figura 10.30 se ilustran modelos para las transposiciones conservativa y replicativa. Como puede observarse, se producen cortes monocatenarios en los extremos del transposón (a nivel de las repeticiones invertidas), y cortes escalonados en una sóla cadena en el sitio diana. El transposón se une luego al sitio diana mediante los extremos monocatenarios. En la transposición conservativa, el sitio donador es ahora cortado y la reparación conservativa rellena los huecos de cadena sencilla del sitio diana.

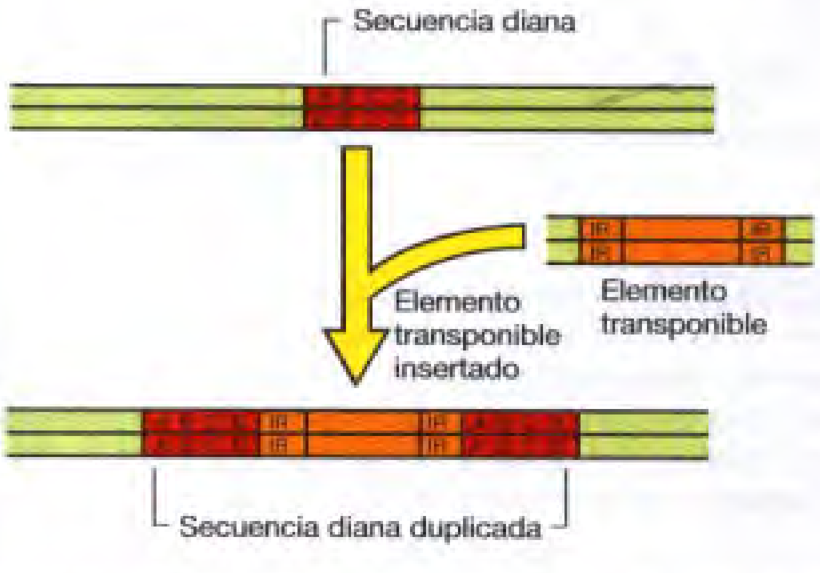


Figura 10.29 Transposición. La inserción de un elemento transponible genera una duplicación de la secuencia diana. Obsérvese la presencia de repeticiones invertidas (IRs) en los extremos del elemento transponible. La Figura 10.30 muestra modelos más detallados del mecanismo de transposición.

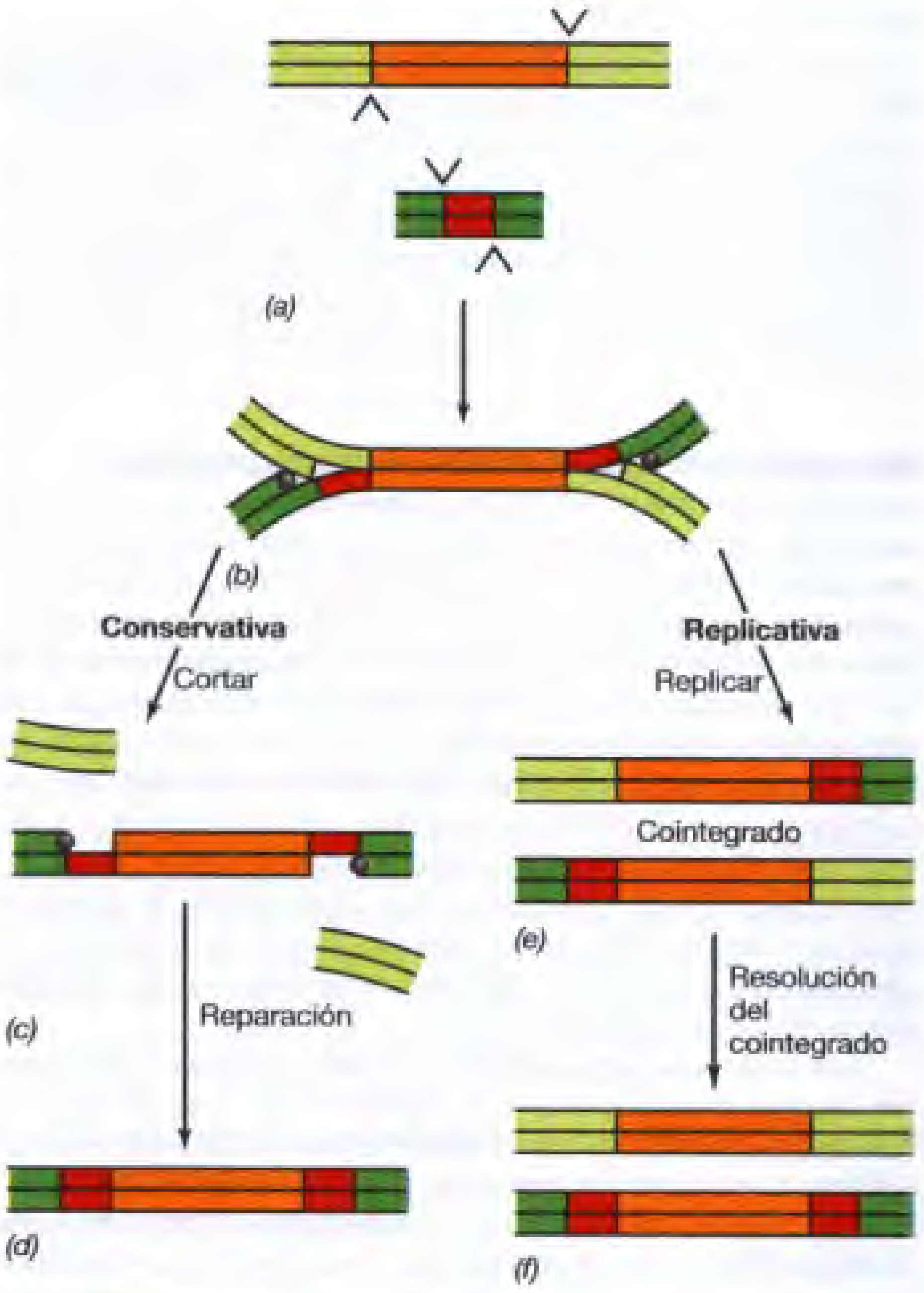


Figura 10.30 Mecanismos de transposición. (a) Tanto en la transposición conservativa como en la replicativa la transposasa genera cortes (marcados con flechas) en las cadenas de DNA en los extremos del elemento transponible (naranja) y del sitio diana (rojo). El número y localización de los cortes puede variar dependiendo del mecanismo. (b) El sitio diana se liga al elemento transponible. Los puntos negros indican los extremos 3' libres de las cadenas de DNA en los que puede ocurrir replicación (*véase* Sección 7.5). (c) En la transposición conservativa ocurren nuevos cortes antes de que tenga lugar la replicación/reparación, y el elemento transponible del DNA donador se pierde. (d) La reparación conduce a la duplicación del sitio diana y finalización de la transposición al nuevo sitio. (e) En la transposición replicativa, la replicación ocurre sin que tenga lugar el corte del elemento transponible del sitio donador originando dos copias del elemento transponible que forman parte de un cointegrado. Nótese, sin embargo, que esto conlleva la unión de las moléculas de DNA del donador (verde claro) y del sitio diana (verde oscuro). (f) Estas moléculas se separan en una reacción posterior. La resolución del cointegrado se muestra en la Figura 10.31.

Este proceso origina la formación de *repeticiones directas* en el sitio diana en los extremos del transposón. En la transposición replicativa, la reparación replicativa ocurre mientras el elemento transponible está aún unido tanto al sitio original como al sitio diana. Esto conduce a la formación de una estructura compuesta llamada *cointegrado*. El proceso final es la *resolución* de la estructura del cointegrado, permitiendo la liberación del transposón original y la presencia de una nueva copia del transposón en el sitio diana (Figura 10.31).

La transposición es esencialmente una *etapa de recombinación*, pero que no ocurre entre secuencias homólogas ni usa el sistema general de recombinación de la célula. Utiliza la proteína especial *transposasa* en lugar de la proteína RecA implicada en la recombinación general. Como esta recombinación requiere una secuencia de bases específica, se llama *recombinación específica de sitio* (en oposición a la recombinación homóloga considerada previamente en esta capítulo).

Mutagénesis con elementos transponibles

Si el sitio de inserción de un elemento transponible está *dentro* de un gen, la inserción del transposón dará como resultado la pérdida de la continuidad lineal del gen, originando una mutación (Figura 10.32). Los transposones representan, por tanto, un medio fácil de crear mutantes a lo largo del cromosoma. El elemento más adecuado para la **mutagénesis por transposón** es el que contiene un gen de resistencia a un antibiótico. Los clones que contienen el transposón se pueden seleccionar aislando colonias resistentes al antibiótico. Si estos clones se seleccionan en medio rico donde pueden crecer auxotrofos, se pueden analizar luego en un medio mínimo suplementado con varios factores de crecimiento para determinar si se requiere algún factor de crecimiento.

Los transposones también resultan útiles para incorporar un gen marcador de auxotrofia en un organismo silvestre. En general, los recombinantes auxotrofos no pueden aislarse por selección positiva, pero si el marcador auxotrófico que se introduce está contenido en un elemento transponible con un marcador de resistencia a un antibiótico, entonces se pueden seleccionar clones resistentes al antibiótico, un procedimiento de selección positiva, y automáticamente obtener clones que han incorporado el marcador auxotrófico.

Dos transposones usado con frecuencia en mutagénesis son el Tn*5* (*véase* Figura 10.29), que confiere resistencia a neomicina y kanamicina, y Tn*10*, que contiene un marcador de resistencia a tetraciclina (*véase* Figura 10.19).

El bacteriófago Mu (*véase* Sección 16.5) se usa también habitualmente como *mutágeno biológico*. Puesto que Mu se integra en una amplia variedad de sitios, se puede utilizar para inducir mutación en múltiples sitios. Además, Mu se puede utilizar para introducir en las células genes que deriven de otras células hospedadoras, lo que constituye una forma de ingeniería genética *in vivo*. Además, se han construido artificialmente fagos Mu modificados en los que se han eliminado algunas de sus funciones líticas. Estos fagos, llamados miniMu, han perdido porciones significativas del genoma de Mu pero tienen los extremos del fago en orientación normal. Los fagos miniMu son normalmente defectivos, esto es, incapaces de formar placas de lisis, y su presencia se detecta por la presencia de otros genes que llevan. Un grupo de fagos miniMu que contienen el gen de la β-galactosidasa del hospedador (llamados Mu*d*-*lac*, la *d* sig-

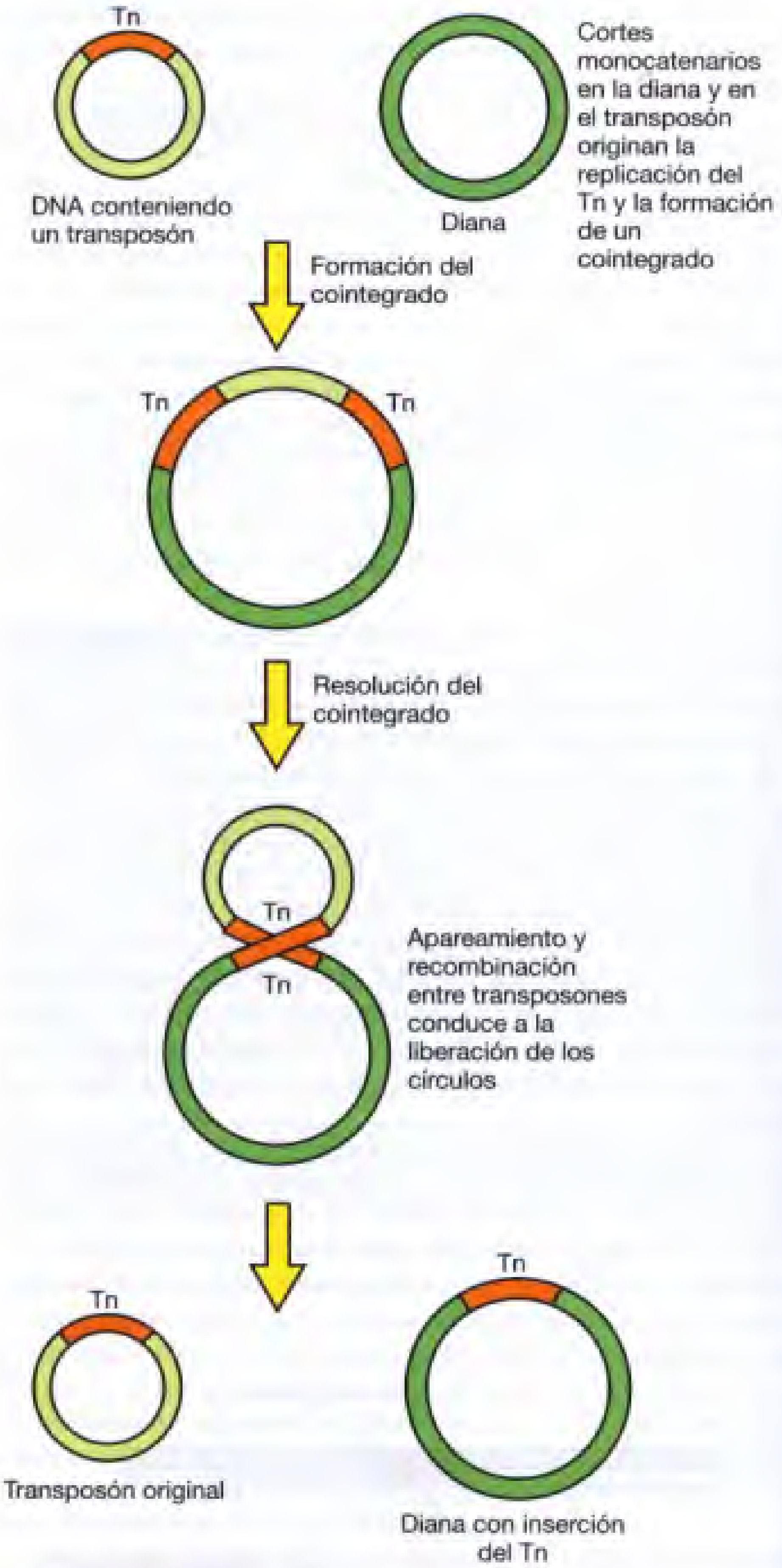

Tn
DNA conteniendo un transposón
Diana
Cortes monocatenarios en la diana y en el transposón originan la replicación del Tn y la formación de un cointegrado
Formación del cointegrado
Tn
Tn
Resolución del cointegrado
Tn
Tn
Apareamiento y recombinación entre transposones conduce a la liberación de los círculos
Tn
Tn
Transposón original
Diana con inserción del Tn

Figura 10.31 Transposición replicativa. Después de la formación de cortes monocatenarios surge una estructura, llamada cointegrado, por asociación de las dos moléculas (*véase* Figura 10.30). Después de la recombinación, la resolución de la estructura del cointegrado conduce a la liberación del transposón original y a la inserción de una copia del transposón en la molécula diana.

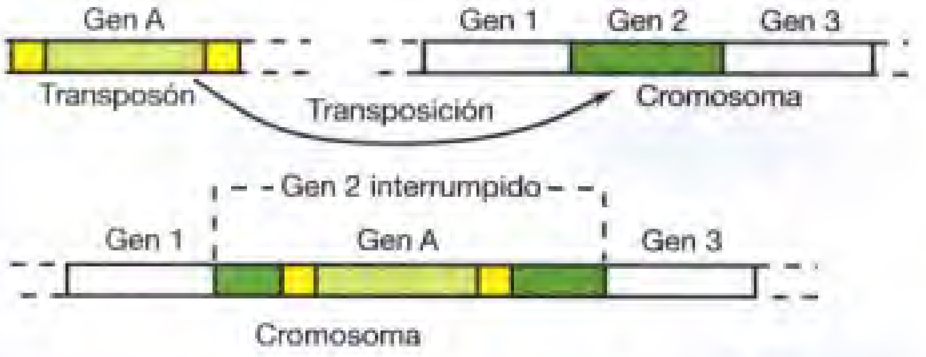


Figura 10.32 Mutagénesis por transposón. El transposón se traslada hasta la mitad del gen 2. El gen 2 está ahora interrumpido por el transposón y queda inactivado. El gen A del transposón se expresará en ambas localizaciones.

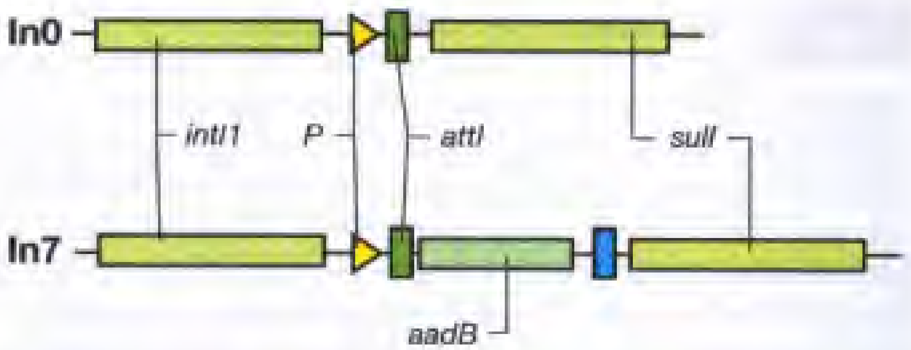


Figura 10.33 Estructura de dos integrones naturales de *Pseudomonas*. El integrón In0 tiene un juego de genes básico: *intI1*, codifica la integrasa; *attI*, el sitio donde puede ocurrir integración específica de sitio; *P*, un promotor; y *sulI*, un gen que confiere resistencia a la sulfamida y que posee su propio promotor. El integrón In7 contiene todos estos genes pero, además, se ha integrado un casete génico. Todos los casetes contienen un sitio (cuadrado azul) para la recombinación específica de sitio. Este casete contiene *aadB*, que confiere resistencia a ciertos antibióticos aminoglicósidos.

nifica «defectivo») se pueden detectar en estado integrado si el gen *lac* está orientado adecuadamente en relación con el promotor del hospedador. En tales condiciones, la célula hospedadora forma la enzima β-galactosidasa, que puede ser detectada en las colonias usando un indicador de color especial. Las colonias β-galactosidasa positivas de un hospedador β-galactosidasa negativo son una indicación de que se ha producido una infección por Mud-*lac*.

Integrones

Debido a que muchos transposones contienen genes que confieren tanto resistencia a antibióticos como la capacidad de transponerse a plásmidos conjugativos, las terapias tradicionales que utilizan antibióticos en el tratamiento de infecciones bacterianas pueden estar seriamente amenazadas. Algunos transposones también contienen otros elementos que les hacen incluso más singulares, los *integrones*. Los **integrones** son elementos genéticos que pueden capturar y expresar genes de otras fuentes. Los integrones poseen un gen que codifica una integrasa. La integrasa es una enzima que cataliza otro tipo de *recombinación específica de sitio*. Recuérdese que el genoma de lambda se integra en el genoma de *Escherichia coli* en un sitio específico mediante la acción de una integrasa codificada por lambda (*véase* Sección 9.10). El integrón también contiene una secuencia específica de DNA donde la integrasa puede funcionar para integrar *casetes génicos* (los cuales están localizados cerca de secuencias similares en otros elementos) y un promotor que puede entonces expresar el gen del casete que acaba de integrarse.

Se han encontrado integrones en diversos miembros de *Bacteria*, por ejemplo, *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Vibrio*, frecuentemente en aislados clínicos. Estos integrones pueden estar en transposones, por ejemplo, Tn7, en plásmidos, o en el cromosoma bacteriano. Algunos aislados tienen incluso 5 casetes génicos diferentes. En estos casetes se han identificado más de 40 genes de resistencia a antibióticos, así como otros genes que se han asociado con virulencia. La Figura 10.33 muestra la estructura de dos integrones de *Pseudomonas aeruginosa*. El significado clínico de los integrones y los casetes génicos que capturan parece obvio. Lo que es menos obvio es el origen de los propios casetes génicos. Éstos no son simplemente genes al azar que pueden ser capturados, sino genes rodeados por secuencias específicas de DNA que son reconocidas por la integrasa y genes que aparentemente no se expresan hasta que forman parte de un integrón y pueden ser transcritos desde el promotor del integrón.

✓ 10.11 Revisión de conceptos

Los transposones y las secuencias de inserción son elementos genéticos que pueden moverse de una localización del cromosoma a otra por un proceso llamado transposición, un tipo de recombinación específica de sitio. La transposición puede ser conservativa o replicativa. Los transposones frecuentemente llevan genes que codifican resistencia a antibióticos. Los transposones pueden usarse como mutágenos biológicos.

- ✓ ¿Qué características comparten las secuencias de inserción y los transposones?
- ✓ ¿Qué son los integrones?

III TECNICAS DE LA GENÉTICA BACTERIANA: *IN VITRO*

Los tres mecanismos de intercambio genético que hemos comentado, transformación (*véase* Sección 10.6), transducción (*véase* Sección 10.7) y conjugación (*véase* Sección 10.9), pueden usarse para hacer cruces bacterianos y seleccionar recombinantes con el fin de confeccionar un mapa genético de un organismo, crear nuevas cepas de un organismo, o estudiar específicamente la genética y bioquímica del metabolismo de un organismo. Existen, sin embargo, severas limitaciones asociadas a la realización de los cruces *in vivo* utilizando estas técnicas. Muchas de estas limitaciones pueden superarse mediante la manipulación del DNA *in vitro*, en un tubo de ensayo. Las siguientes secciones de este capítulo comentan algunas de estas técnicas *in vitro*.

10.12 Enzimas de restricción

En el Capítulo 9, comentamos el hecho de que los procariotas tienen enzimas de restricción y modificación cuyas funciones parecen proteger a las células de DNA extraño, tal como DNA viral (*véase* Sección 9.6). Aunque estos sistemas están ampliamente extendidos entre los procariotas (tanto *Bacteria* como *Archaea*), son muy raros en eucariotas. De hecho, los únicos sistemas de restricción y modificación «eucarióticos» conocidos se encuentran en virus que infectan ciertas plantas unicelulares (*véase* Sección 16.6). (Algunos virus procarióticos tienen también sus propios sistemas de restricción y modificación.) Recuérdese que la función de las **enzimas de restricción** (endonucleasas de restricción), que son parte de estos sistemas, es reconocer ciertas secuencias de DNA y cortar el DNA. Una clase numerosa de estas enzimas, llamada enzimas de restricción tipo II, no sólo reconoce secuencias específicas sino también corta el DNA bicatenario dentro de estas secuencias. Tales enzimas se han mostrado enormemente útiles en muchas de las técnicas de manipulación genética *in vitro*. De hecho, el descubrimiento de estas enzimas marcó el comienzo de lo que se denominó *ingeniería genética* (*véase* Capítulo 31).

Muchas de las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción tipo II exhiben simetría binaria alrededor de un punto dado. La Figura 10.34 muestra la secuencia que es reconocida y cortada por una enzima de restricción de *Escherichia coli* llamada *Eco*RI.

Los sitios de corte se indican con flechas y el eje de simetría por una línea discontinua. Nótese que las dos bandas tienen la misma secuencia si una se lee desde la izquierda y la otra desde la derecha (o, en términos de polinucleótidos, si ambas son leídas en la dirección 5′ → 3′ o en la dirección 3′ → 5′). Tal estructura se denomina **palíndrome**. (Un palíndrome es una secuencia de caracteres que dice lo mismo cuando se lee desde la derecha que desde la izquierda, por ejemplo, *ana la galana*. El término *palindrome* deriva del griego y significa «recorrer hacia atrás».)

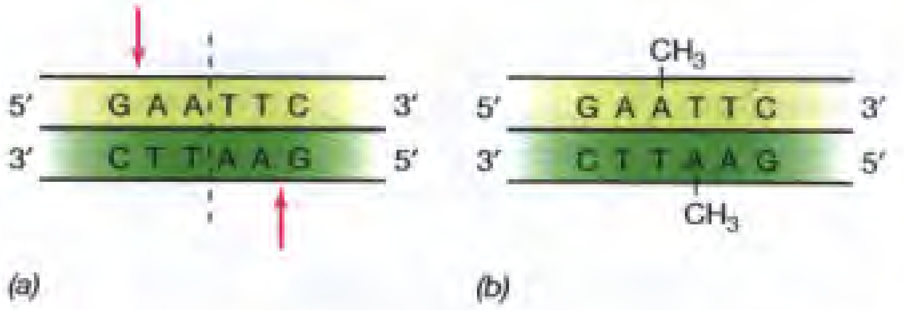


Figura 10.34 Restricción y modificación del DNA. (a) La secuencia de DNA reconocida por la endonucleasa de restricción *Eco*RI. La flecha roja indica los enlaces cortados por la enzima. La línea discontinua indica el eje de simetría de la secuencia. (b) La misma secuencia después de su modificación por la *Eco*RI metilasa. Se muestran los grupos metilo añadidos por esta enzima.

Muchas enzimas de restricción están compuestas de dos subunidades polipeptídicas iguales, y cada subunidad reconoce y corta la secuencia de una de las bandas. Puesto que las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción son relativamente cortas, y frecuentemente palindrómicas, tales enzimas producen siempre *cortes en las dos bandas* del DNA. Resulta llamativo que las enzimas de restricción que reconocen secuencias *no* palindrómicas cortan cerca de la secuencia, pero no dentro de ella.

En la Tabla 10.4, se muestran las secuencias de reconocimiento y los sitios de corte de algunas enzimas de restricción. Nótese que los sitios de reconocimiento de las enzimas indicadas son 4, 6 y 8 pares de bases. En una molécula «aleatoria» de DNA, uno esperaría que cualquier secuencia de cuatro pares de bases ocurriera aproximadamente una vez cada 256 pares de bases sobre la base de la probabilidad $\frac{1}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{4}$ (asumiendo que cada par de bases es igualmente probable en el DNA). Por tanto, una enzima que reconoce un sitio de restricción de 4 pares de bases cortaría una molécula de DNA grande en muchos fragmentos específicos. Una secuencia específica de 6 pares de bases debería aparecer cada 4096 pares de bases en un DNA aleatorio, y una secuencia de 8 pares de bases debería apa-

TABLA 10.4 Secuencias de reconocimientos de algunas endonucleasas de restricción

Organismo	Denominación de la enzima	Secuencia de reconocimiento[a]
Bacillus subtilis	*Bsu*RI	GG ↓ $\overset{*}{\mathrm{C}}$C
Brevibacterium albidum	*Bal*I	TGG ↓ $\overset{*}{\mathrm{C}}$CA
Escherichia coli	*Eco*RI	G ↓ A$\overset{*}{\mathrm{A}}$TTC
Haemophilus haemolyticus	*Hha*I	G$\overset{*}{\mathrm{C}}$G ↓ C
Haemophilus influenzae	*Hind*II	GTPy ↓ PuA$\overset{*}{\mathrm{C}}$
Haemophilus influenzae	*Hind*III	A ↓ AGCTT
Nocardia otitidis-caviarum	*Not*I	GC ↓ GG$\overset{*}{\mathrm{C}}$CGC
Thermus aquaticus	*Taq*I	T ↓ CG$\overset{*}{\mathrm{A}}$

[a] Las flechas indican los sitios del ataque enzimático. Los asteriscos indican el sitio de metilación (modificación). G, guanina; C, citosina; A, adenina; T, timina; Pu, cualquier purina; Py, cualquier pirimidina. Sólo se indican secuencias 5′ → 3′.

recer una vez por cada megapar de bases. El cromosoma de *Escherichia coli*, que tiene 4,6 megapares de bases, es cortado 21 veces por la enzima *Not*I, que reconoce una secuencia de 8 pares de bases, lo que indica que en este cromosoma la secuencia de reconocimiento de *Not*I está presente con una frecuencia algo mayor que la que uno podría predecir.

Se conocen actualmente más de 2000 enzimas de restricción con más de 200 especificidades diferentes. Otras están siendo investigadas debido a la gran importancia de estas enzimas en la investigación genética. Consideremos que la enzima *Eco*RI puede cortar *cualquier* DNA bicatenario que tenga su secuencia de reconocimiento y corta solamente en esa secuencia. Esto permite al científico cortar grandes moléculas de DNA en fragmentos más cortos. Tales fragmentos, que poseen extremos definidos creados como resultado de la acción de enzimas de restricción específicas, tienen muchos usos. Las enzimas de restricción son herramientas de una utilidad tal en la investigación de la biología molecular moderna, que se han hecho accesibles comercialmente. Varias casas comerciales purifican y venden enzimas de restricción con diversas especificidades.

Modificación: protección de la restricción

Una parte integral de los sistemas de restricción-modificación es la enzima modificante, la cual **modifica** las secuencias específicas en su *propio* DNA de manera que no sean atacadas por las propias enzimas de restricción de la célula. Tal modificación generalmente implica *metilación* de bases específicas dentro de la secuencia de reconocimiento, de modo que la nucleasa de restricción no pueda actuar. Así, para cada enzima de restricción debe haber una enzima de modificación, estando ambas enzimas fuertemente asociadas. Por ejemplo, la secuencia reconocida por la enzima de restricción *Eco*RI (*véase* Figura 10.34*a*) puede modificarse por metilación de las dos adeninas más internas (Figura 10.34*b*). La enzima que lleva a cabo esta modificación se llama *Eco*RI metilasa. Incluso si se modifica una sola banda, la secuencia deja de ser un sustrato para la enzima de restricción *Eco*RI.

Análisis del DNA mediante enzimas de restricción

Como se ha indicado, una molécula de DNA será cortada a nivel de secuencias específicas por una enzima de restricción determinada. Puesto que las secuencias de bases reconocidas por un gran número de enzimas de restricción poseen entre cuatro y seis nucleótidos de longitud, habrá un número limitado de tales secuencias en una pieza de DNA. Después de cortar el DNA, los fragmentos generados pueden separarse entre sí por **electroforesis en gel**.

La electroforesis es el procedimiento por el cual moléculas cargadas migran en un campo eléctrico, estando la velocidad de migración determinada por la carga y el tamaño de la molécula. En la electroforesis en gel las moléculas se separan en un gel, compuesto por lo general de agarosa o poliacrilamida. El gel es una malla compleja de fibrillas y el tamaño del poro del gel, el cual controla la separación, puede ser manipulado por el experimentador. Los ácidos nucleicos (que están negativamente cargados) migrarán a través del gel, una vez que se aplique la corriente eléctrica, a velocidades dependientes de la forma y tamaño de la molécula. Moléculas pequeñas o compactas migran más rápidamente que las moléculas grandes. Después de un periodo definido de tiempo de migración el gel puede «teñirse» con un compuesto que se una al DNA. Si se usa bromuro de etidio (*véase* Sección 10.3) como colorante, las bandas fluorescen bajo la luz ultravioleta.

En la Figura 10.35, se muestra un gel típico de agarosa. En la calle A, se ha aplicado una digestión estándar, de la que se conoce el tamaño de cada banda. Las otras calles contienen

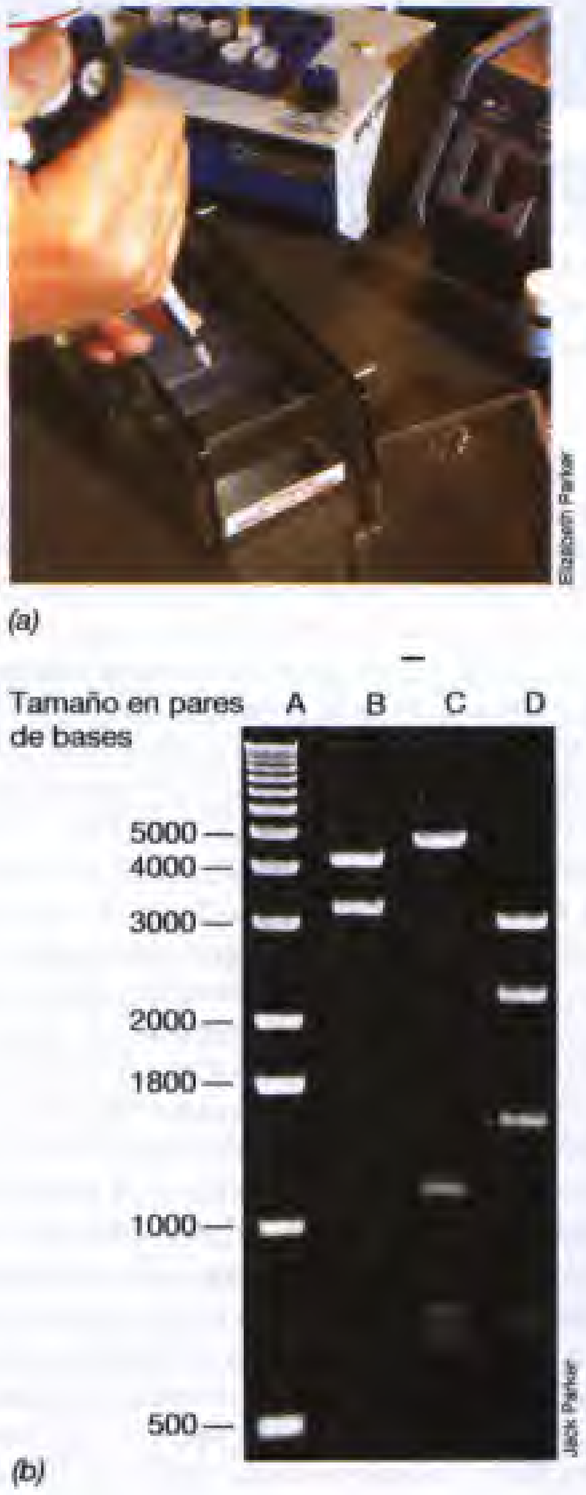
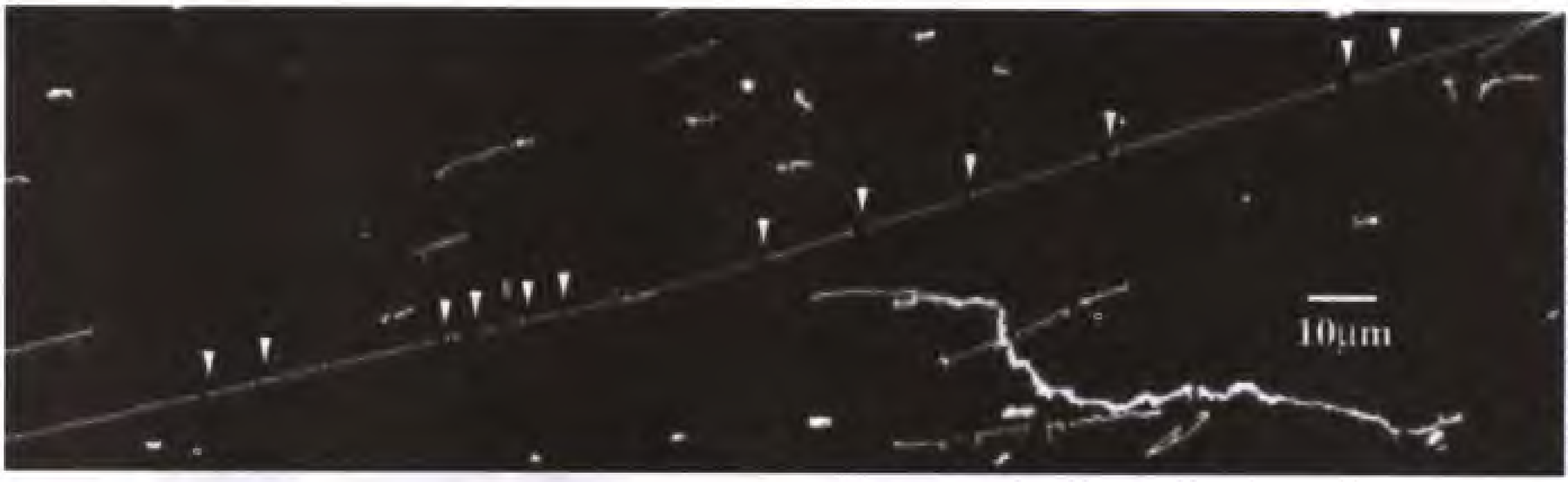


Figura 10.35 Electroforesis de DNA en gel de agarosa. (a) La muestra de DNA se carga en los pocillos de un gel de agarosa parcialmente sumergido. (b) Fotografía de un gel de agarosa teñido. El DNA ha sido cargado en pocillos hacia la parte superior del gel, como se indica, y el polo positivo del campo eléctrico está en la parte inferior. La muestra de la calle A contiene fragmentos de tamaño conocido que se usan como estándares. Usando los estándares, se puede determinar el tamaño de los fragmentos en las otras calles. Aunque cada banda de una calle particular contiene el mismo número de moléculas fragmentadas, las bandas inferiores se tiñen menos intensamente porque los fragmentos son más pequeños y, químicamente, hay menos DNA para teñir.



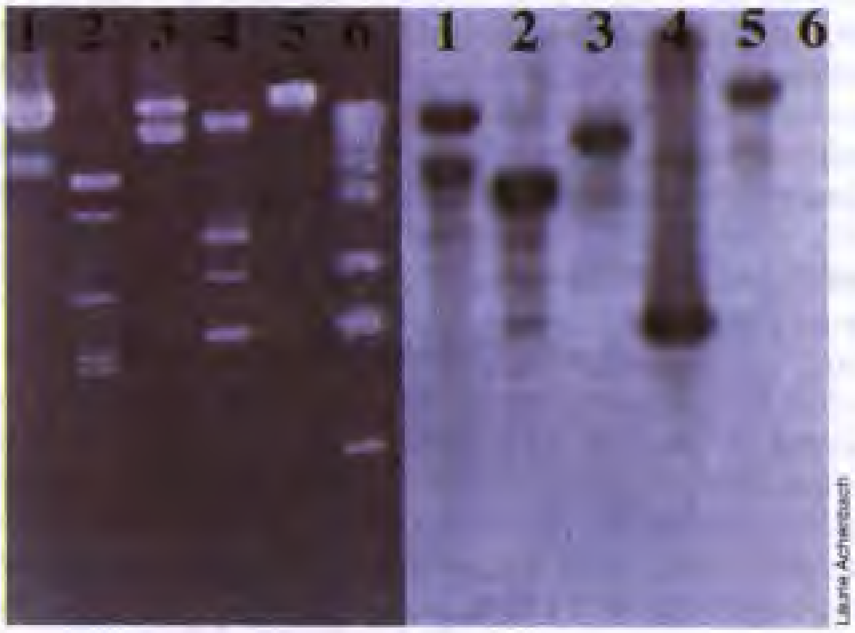
Alex Lim, Eileen Dimalanta y David C. Schwartz

Figura 10.36 Mapeo óptico de fragmentos de restricción. La figura muestra una micrografía de fluorescencia digital de una porción del cromosoma de *Escherichia coli* digerido con la enzima de restricción *Xho*I (originalmente aislada de *Xanthomonas holica*). Los sitios de corte para la enzima de restricción se indican con flechas. La imagen se construyó a partir de una serie de imágenes. Se utilizó el DNA del bacteriófago lambda (*véase* Sección 9.10) como estándar del tamaño. El sistema se ha usado para crear mapas de restricción del cromosoma completo de *E. coli*, y de otras *Bacteria* como *Deinococcus radiodurans*.

una fuente de DNA purificado (en este caso un plásmido) cortado por una o más enzimas de restricción. Dado que una determinada enzima de restricción siempre corta en el mismo sitio, el modelo de bandeo es reproducible, y puede determinarse el tamaño de los fragmentos usando un estándar. Esta técnica se utiliza para generar un **mapa físico** del DNA, en el que los sitios que se mapean no son genes o mutaciones sino la localización de los sitios de restricción de las enzimas. La creación de mapas físicos de esta manera implica hacer varias digestiones con varias enzimas de restricción, solas o en combinaciones, y luego determinar cómo deben ordenarse las piezas, de manera similar a la resolución de un rompecabezas. Cada calle en el gel mostrado en la Figura 10.35 contiene muchos millones de fragmentos idénticos de DNA. El acoplamiento de la digestión con enzimas de restricción de una sola molécula de DNA con la microscopía permite confeccionar directamente un mapa a partir de la observación de los cortes en una única molécula. Esta técnica, llamada *mapeo óptico*, se muestra en la Figura 10.36.

Los fragmentos de DNA pueden purificarse a partir de geles, lo que resulta útil en algunos experimentos de clonación (*véase* Sección 10.15). Sin embargo, se pueden dar otros usos a estos geles, uno de los cuales implica la *hibridación de ácidos nucleicos* o simplemente **hibridación**.

Recuérdese (*véase* Sección 7.2) que cuando se desnaturaliza el DNA (*i.e.*, se hace monocatenario), puede utilizarse para formar moléculas híbridas con otras moléculas de DNA monocatenario (o RNA) que posean secuencias complementarias o casi complementarias. Estas últimas moléculas se llaman **sondas de ácidos nucleicos**, o simplemente, **sondas**. La hibridación puede ser muy útil para encontrar secuencias similares en elementos genéticos diferentes, o para encontrar la localización de un gen específico. E. M. Southern desarrolló una técnica para hibridar con sondas fragmentos de DNA que han sido separados por electroforesis en gel. Los fragmentos de DNA del gel se transfieren a una membrana y se desnaturalizan. La membrana se expone luego a una sonda marcada para permitir que se formen híbridos si la sonda es complementaria a cualquiera de los fragmentos (los propios fragmentos quedan fijados a la membrana y no pueden regenerar la doble hélice). Los sitios de hibridación pueden detectarse revelando el marcaje que se ha unido a la membrana. Las sondas pueden marcarse con radiactividad o con una variedad de agentes que producen compuestos coloreados o incluso emiten luz. El procedimiento de hibridación, cuando el DNA está en el gen y la sonda es DNA o RNA, se llama *Southern blot*, de-



Laurie Achenbach

Figura 10.37 Transferencia Southern. (Panel de la izquierda) Electroforesis en gel de agarosa de las moléculas de DNA. Las moléculas de DNA purificado de diferentes plásmidos se trataron con enzimas de restricción y se sometieron a electroforesis. (Panel de la derecha) Transferencia Southern, del gel de DNA mostrado a la izquierda. Tras la inmunotransferencia se realizó la hibridación con la sonda marcada radiactivamente. Las posiciones de las bandas se detectaron por una radiografía de rayos X. Nótese que sólo algunos de los fragmentos de DNA tienen secuencias complementarias a las de las sondas marcadas. La línea 6 contiene el DNA usado como marcador de tamaño y ninguna de sus bandas hibridiza con la sonda.

bido al científico que lo descubrió. Cuando en el gel hay RNA y la sonda es DNA o RNA, el procedimiento se llama *Northern blot*. (Un *Western blot* o *inmunoblot* implica proteína en el gel y un anticuerpo como sonda, *véase* Sección 24.12.) La Figura 10.37 muestra cómo puede utilizarse un Southern blot para identificar fragmentos de DNA que contenga una región (o un gen) que hibride con la sonda.

✓ 10.12 Revisión de conceptos

Las enzimas de restricción son enzimas celulares que reconocen secuencias específicas cortas en el DNA y producen un corte en cada una de las cadenas sencillas, tan cercanos entre sí, que el resultado es un corte en la doble cadena del DNA. Los productos de la digestión con una enzima de restricción pueden separarse mediante electroforesis en gel.

- ✓ ¿Por qué las enzimas de restricción son útiles en genética?
- ✓ ¿Qué es un *Southern blot*?

10.13 Secuenciación y síntesis de DNA

Otro avance técnico que cambió el estudio de la genética fue el desarrollo de métodos para secuenciar DNA. Además, existen procedimientos para sintetizar moléculas de DNA con secuencias definidas para utilizarse como sondas (*véase* Sección 10.12), ayudar en la secuenciación de DNA, o incluso construir genes enteros (*véase* Sección 31.15).

Secuenciación del DNA

A mediados de la década de los 70, se desarrollaron dos procedimientos diferentes para secuenciar DNA: el método de *Maxim y Gilbert* y el método de los *dideoxi de Sanger*. En su versión original, ambos métodos generan fragmentos de DNA que terminan en una de las cuatro bases y que son radiactivos. Estos fragmentos se someten luego a electroforesis en gel de manera que separen en el mismo moléculas que difieren en sólo un nucleótido de longitud. Ambos procedimientos implican cuatro calles separadas para la determinación de cada secuencia, una para cada grupo de fragmentos que terminan en una de las cuatro bases del DNA: adenina, guanina, citosina y timina. Las posiciones de los fragmentos se localizan por autorradiografía y las secuencias se leen en el gel.

Las diferencias entre los dos procedimientos surge del método que utilizan para generar los fragmentos aleatorios con nucleótidos conocidos en los extremos. El procedimiento de Maxiam-Gilbert usa compuestos químicos que rompen el DNA preferentemente a nivel de cada uno de los cuatro nucleótidos. En el procedimiento dideoxi de Sanger, la secuencia se determina en la práctica generando una *copia* de la cadena sencilla del DNA, utilizando la enzima *DNA polimerasa*. Esta enzima usa desoxirribonucleósidos trifosfato como sustratos y los añaden a un *iniciador* (*véase* Sección 7.5). En las mezclas de incubación (cuatro tubos de ensayo separados), hay pequeñas cantidades de cada uno de los análogos dideoxi de los desoxirribonucleósidos trifosfato (*véase* Figura 10.38). Puesto que el dideoxiazúcar carece del 3′-hidroxilo, la cadena no puede continuar alargándose. El análogo dideoxi actúa como un *reactivo específico de terminación de la cadena*. Se obtienen fragmentos de longitud variable, dependiendo de las condiciones de incubación. Los fragmentos de ácido nucleico formado son radiactivos debido a la utilización de un iniciador radiactivo o un deoxinucleósido trifosfato en las reacciones. Se lleva a cabo la electroforesis de estos fragmentos y mediante autorradiografía se determina la posición de las bandas radiactivas. Alineando las cuatro calles de dideoxirribonucleótidos y anotando la posición vertical de cada fragmento en relación con su vecino, puede leerse en el gel la secuencia de la copia del DNA (Figura 10.39).

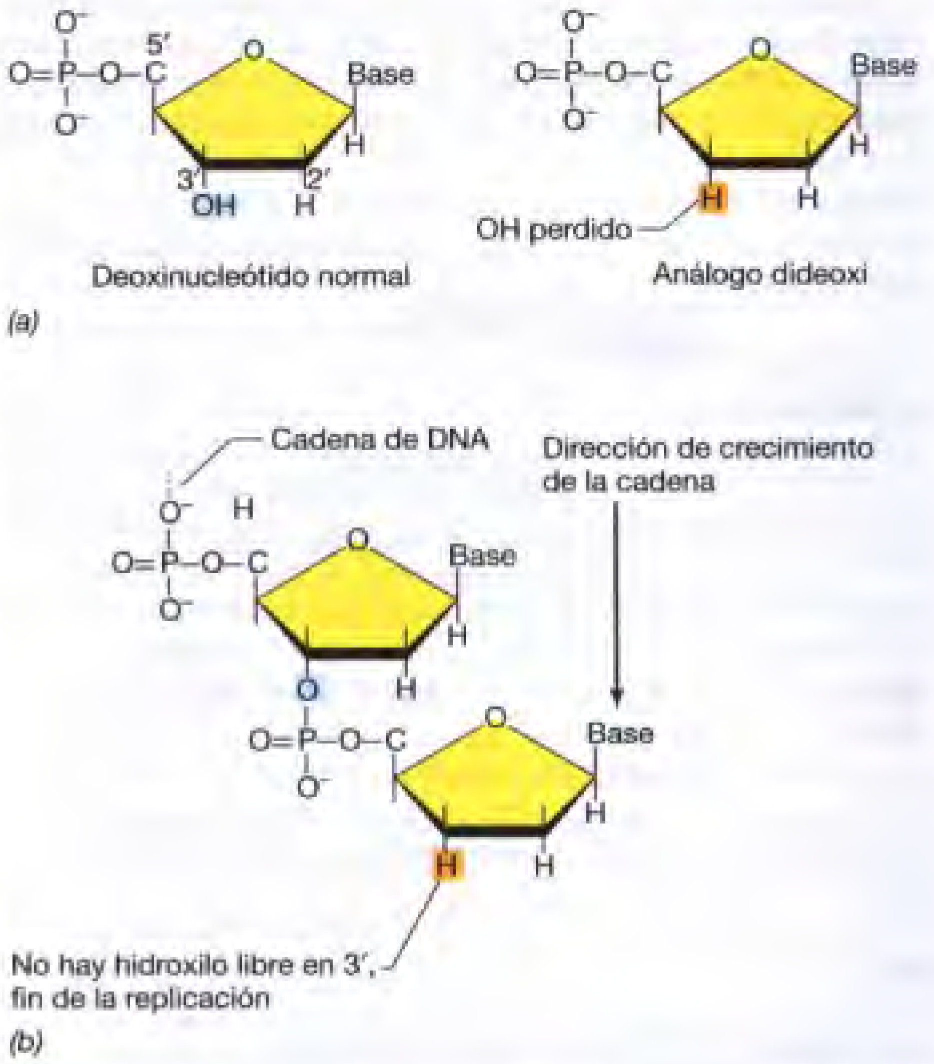
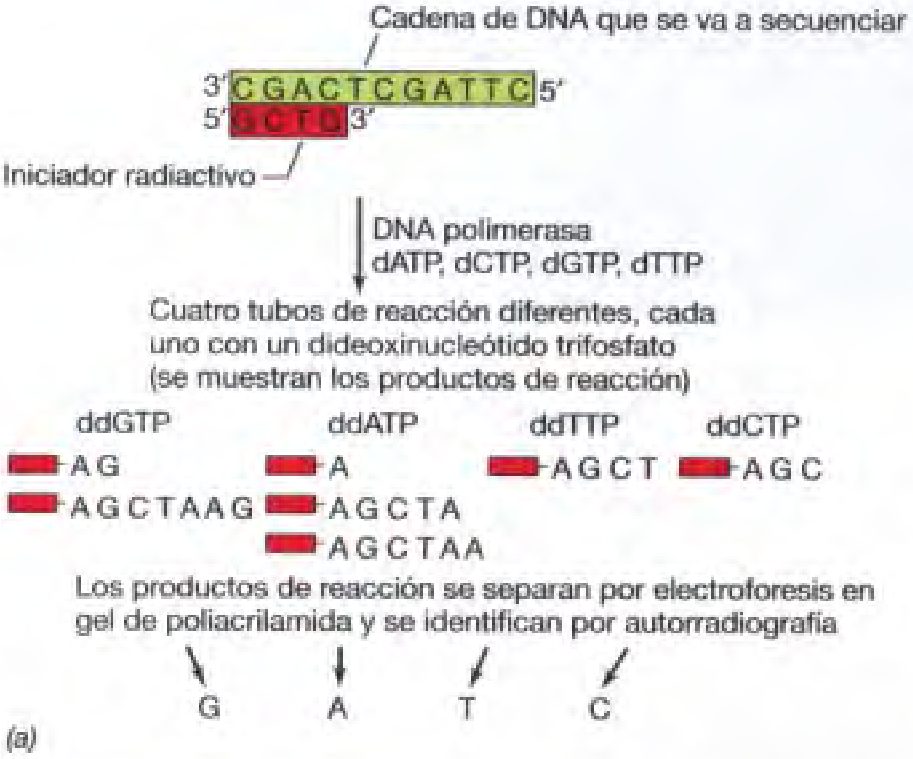


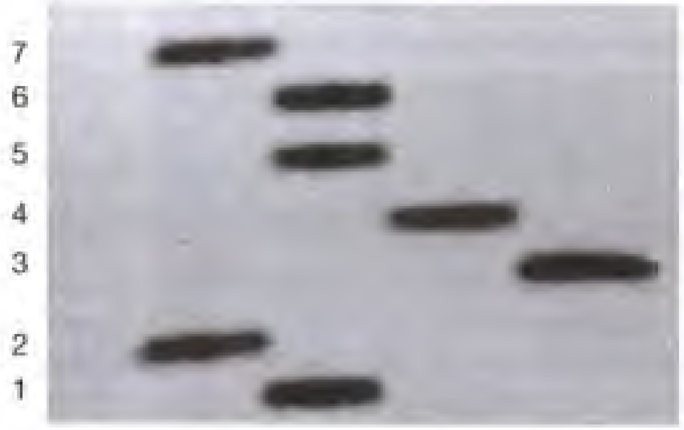
Figura 10.38 Dideoxinucleótidos y secuenciación por el método de Sanger. (a) Un deoxinucleótido normal tiene un grupo hidroxilo en el carbono 3′, mientras que un dideoxinucleótido no lo tiene. (b) Tras la incorporación de un dideoxinucleótido causará la terminación de la cadena.

Una ventaja importante del método de Sanger es que puede usarse para secuenciar tanto RNA como DNA. Para secuenciar RNA, se hace una copia del DNA monocatenario (utilizando el RNA como molde) mediante la enzima transcriptasa reversa. Al sintetizar el DNA monocatenario en presencia de los dideoxinucleótidos, se generan fragmentos de DNA de tamaño variable adecuados para ser secuenciados por el método de Sanger. La secuencia del RNA se deduce de la del DNA mediante las reglas de apareamiento de bases. Para determinarla secuencia del DNA de una molécula larga, tal como un gen completo, es necesario proceder en etapas. Primero se rompe el DNA en pequeños fragmentos que se solapen y se determina la secuencia de cada fragmento. Utilizando los solapamientos como guía, puede deducirse la secuencia de la molécula completa.

Las solicitudes de proyectos que implican secuenciación de genomas enteros (*véase* Capítulo 15) han conducido al desarrollo de sistemas de secuenciación enzimática del DNA. Con tales sistemas, las reacciones de secuenciación se basan aún en la metodología dideoxi, pero se utilizan iniciadores marcados con colorantes fluorescentes (o bases), de manera que se puedan detectar las bandas fácilmente. Los productos se separan mediante electroforesis automatizada y las bandas se detectan mediante espectroscopía de fluorescencia. En un procedimiento, cada una de las cuatro reacciones diferentes usan un colorante fluorescente diferente, de manera que las cuatro reacciones pueden correrse en una única calle. Los resultados son analizados por una computadora y la secuencia se imprime de manera que cada una de las cuatro letras aparece en un color determinado (Figura 10.39*c*).

Nótese que la secuenciación tipo Sanger requiere un iniciador de secuencia conocido. Esto es, el iniciador debe ser complementario a una porción del DNA que se va a secuenciar. Este obstáculo es fácilmente superado ya que el DNA que se va a secuenciar ha sido **clonado** (*véase* Sección 10.14); así la secuencia conocida a utilizar será la del **vector de clonación** (*véanse* Secciones 10.15 y 10.16). El propio iniciador puede sintetizarse químicamente.


Cadena de DNA que se va a secuenciar
3' CGACTCGATTC 5'
5' GCTG 3'
Iniciador radiactivo
DNA polimerasa
dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Cuatro tubos de reacción diferentes, cada uno con un dideoxinucleótido trifosfato (se muestran los productos de reacción)
ddGTP
ddATP
ddTTP
ddCTP
AG
AGCTAAG
A
AGCTA
AGCTAA
AGCT
AGC
Los productos de reacción se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida y se identifican por autorradiografía
G
A
T
C
(a)



La secuencia que se lee de abajo arriba es A G C T A A G. La secuencia del DNA desconocido es 3' T C G A T T C

(*b*)

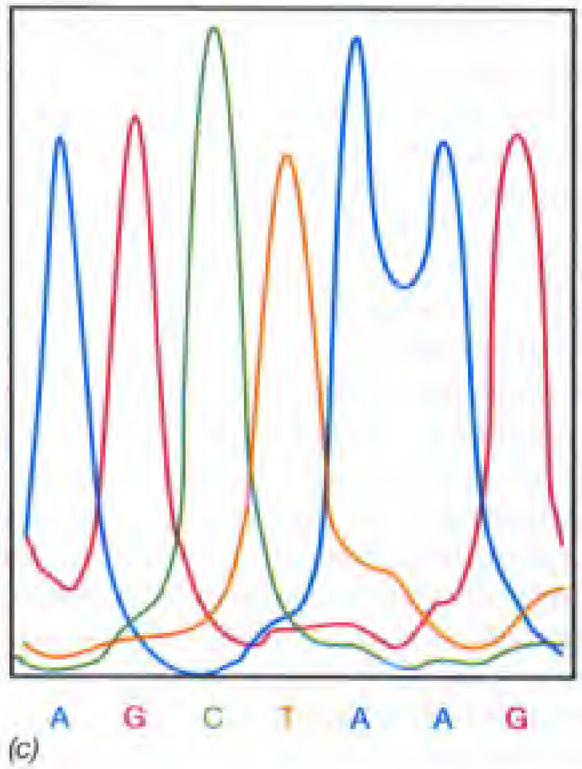


Figura 10.39 Secuenciación del DNA mediante el método de Sanger. (a) La banda del DNA molde es el DNA cuya secuencia se quiere determinar. Nótese que deben realizarse cuatro reacciones diferentes, una con cada nucleótido. (b) Una porción del gel con los productos de reacción. (c) Resultado de la secuenciación del mismo DNA mostrado en (a) y (b), pero usando un secuenciador automático y marcajes fluorescentes.

DNA sintético

Los procedimientos para obtener **DNA sintético** pueden ser completamente automatizados de modo que se puede hacer un oligonucleótido de 30-35 bases en unas horas y, si es necesario, se pueden hacer oligonucleótidos de más de 100 bases de longitud. Para la síntesis de poligonucleótidos más largos, los oligonucleótidos deben unirse enzimáticamente usando una DNA ligasa.

El DNA se sintetiza en un *proceso de fase sólida* en el que el primer nucleótido de la cadena se sujeta a un soporte poroso insoluble (tal como silica gel con un tamaño de partícula de 50 m). El proceso completo, cuyos detalles químicos no nos interesan ahora, se muestra en la Figura 10.40. Se necesitan varias etapas para la adición de cada nucleótido. Después de completarse cada etapa, se extrae la mezcla de reacción del soporte sólido y se repite la serie de reacciones que adicionan el siguiente nucleótido. Una vez que se alcanza la longitud deseada, el oligonucleótido se libera del soporte de la fase sólida y se purifica para eliminar los subproductos y los contaminantes.

Las moléculas de DNA sintético se utilizan ampliamente con fines variados. Además de su uso como iniciadores para secuenciar DNA, se usan como iniciadores para la reacción de la polimerasa en cadena (*véase* Sección 10.7). Además, se utilizan como *sondas* para detectar, mediante hibridación de ácidos nucleicos, secuencias de DNA específicas (Figura 10.37). Más adelante (*véase* Sección 10.18) se describirá cómo puede usarse DNA sintético en un proceso llamado **mutagénesis dirigida** para crear mutaciones en lugares específicos del genoma.

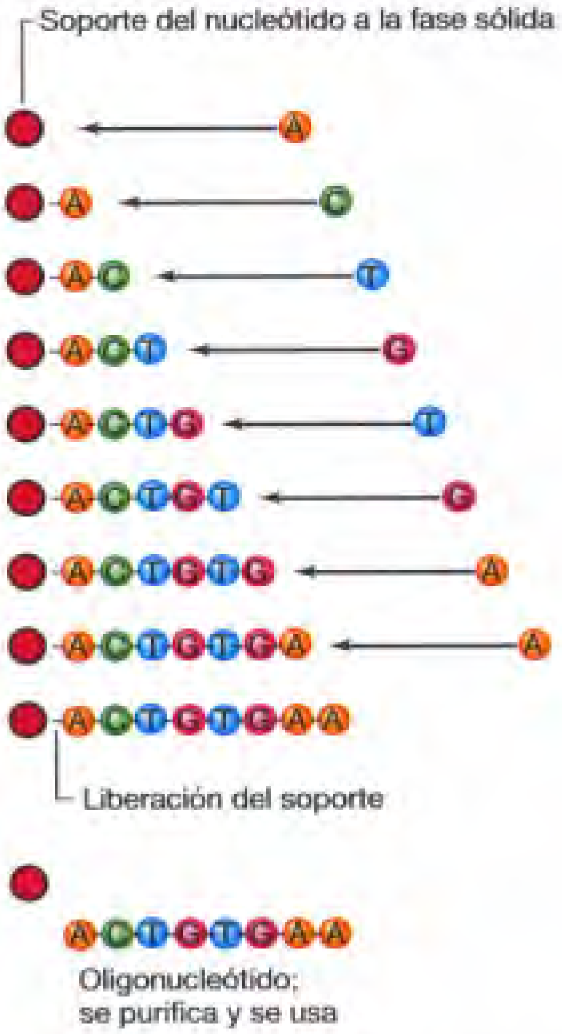


Figura 10.40 Procedimiento para la síntesis de fragmentos de DNA de secuencia definida en fase sólida. La síntesis química procede por adición de nucleótidos, de uno en uno, de la cadena en crecimiento.

✓ 10.13 Revisión de conceptos

El DNA puede secuenciarse por el método de Sanger, que implica copiar el DNA que se va a secuenciar pero utilizando dideoxinucleótidos que terminan la cadena. Los productos finales se separan por electroforesis y se leen las secuencias. Los iniciadores de DNA cortos requeridos por este método pueden sintetizarse químicamente.

✓ ¿Por qué los métodos utilizados para secuenciar DNA requieren el uso de *cuatro* reacciones diferentes?

10.14 Clonación molecular

La **clonación molecular** está en la base de la mayoría de los procedimientos de ingeniería genética y ha facilitado enormemente el análisis de cualquier genoma. La finalidad de la clonación molecular (también llamada *clonación génica*) es aislar grandes cantidades de genes específicos o fragmentos cromosómicos en forma pura. Aunque teóricamente es posible aislar físicamente fragmentos de DNA puro mediante digestión de DNA cromosómico con enzimas de restricción (*véase* Sección 10.12), una ligera reflexión demostrará la imposibilidad práctica de esta aproximación experimental. Considérese que incluso para un organismo genéticamente simple como *Escherichia coli*, un gen específico representa 1-2 kilobases (kb) de un genoma de más de 4600 kb. Un gen medio de *E. coli* representa, por término medio, menos del 0,05% del total del DNA celular. En humanos, el problema es incluso peor debido no sólo a que las regiones codificantes de los genes estándares son mucho más grandes que en *E. coli*, sino a que el genoma es casi 1000 veces mayor. Por el contrario, el DNA del bacteriófago lambda tiene sólo 50 kb, y el DNA de algunos plásmidos es de menos de 5 kb. En estos elementos genéticos, un gen de tipo medio representa el 2-40% del DNA.

Por tanto, la estrategia básica de la clonación molecular consiste en trasladar el gen o región deseada, desde un genoma grande y complejo, a otro pequeño y sencillo. Afortunadamente, nuestro conocimiento de la química y enzimología del DNA nos permiten separar y juntar moléculas de DNA *in vitro*. Este proceso se conoce como *recombinación in vitro*. Las enzimas de restricción, la DNA ligasa (*véanse* Secciones 7.6 y 10.12) y el DNA sintético (*véase* Sección 10.13) son importantes herramientas utilizadas en la recombinación *in vitro*.

La clonación molecular puede dividirse en varias etapas:

1. Aislamiento y fragmentación del DNA de partida. Éste puede ser DNA genómico de un organismo de interés, DNA sintetizado a partir de un molde de RNA por la transcriptasa reversa (*véase* Sección 9.12), el DNA sintetizado por la reacción de la polimerasa en cadena (*véase* Sección 10.17) o incluso DNA totalmente sintético hecho *in vitro*. Si la fuente es DNA genómico, se corta por lo general con enzimas de restricción para originar una serie de fragmentos.

2. Unión de los fragmentos de DNA a un *vector de clonación* con DNA ligasa. Los pequeños elementos genéticos usados para replicar genes se conocen como **vectores de clonación.** Los vectores de clonación están generalmente diseñados para permitir la recombinación de DNA foráneo en un sitio de restricción que corta el vector sin afectar a su replicación. Si el DNA de partida y el vector se cortan con la misma enzima de restricción, la unión puede lograrse por acoplamiento de las regiones monocatenarias llamadas «extremos cohesivos» (*véase* Sección 10.12 y Figura 7.7). Los «extremos romos» generados por diferentes enzimas de restricción pueden también unirse mediante el uso de **adaptadores** («DNA **linkers**»). Las propiedades de los vectores de clonación se comentan en las Secciones 10.15 y 10.16, así como en el Capítulo 31.

3. Introducción y mantenimiento en un organismo **hospedador.** El DNA recombinante generado en el tubo de ensayo se introduce en un organismo hospedador, por ejemplo, mediante transformación con el DNA (*véase* Sección 10.6), donde pueda replicarse. La transferencia del DNA al hospedador genera a menudo una mezcla de clones. Algunas células contienen el gen deseado clonado, mientras otras células contienen otros clones generados por unión de otros fragmentos de DNA al vector. Esta mezcla de clones se denomina **genoteca** o **librería de genes** ya que pueden purificarse muchos clones diferentes a partir de la mezcla, conteniendo

cada uno diferentes segmentos de DNA clonados procedentes del organismo elegido. La confección de una librería de genes por clonación de fragmentos aleatorios de un genoma se llama **clonación por shotgun**.

✓ 10.14 Revisión de conceptos

El aislamiento de un gen específico o región de un cromosoma por clonación molecular se hace generalmente usando un plásmido o virus como vector de clonación. Las enzimas de restricción y la DNA ligasa se utilizan en un proceso de recombinación *in vitro* para producir la molécula de DNA híbrido. Una vez introducido en un hospedador adecuado, el DNA diana puede ser producido en grandes cantidades bajo el control del vector de clonación.

- ✓ ¿Cuál es la finalidad de la clonación molecular?
- ✓ ¿Qué papel desempeñan el vector de clonación, las enzimas de restricción y la DNA ligasa en la clonación molecular?

10.15 Los plásmidos como vectores de clonación

Los plásmidos se replican independientemente del cromosoma del hospedador (*véase* Sección 10.8). Además de llevar los genes requeridos para su propia replicación, la mayoría de los plásmidos son vectores naturales porque con frecuencia llevan otros genes que confieren propiedades importantes a sus hospedadores. Tales genes pueden ser adquiridos por recombinación dentro del hospedador. En ingeniería genética, los genéticos añaden genes a un plásmido en el tubo de ensayo.

Los plásmidos poseen propiedades muy útiles como vectores de clonación. En estas propiedades se incluyen (1) su *pequeño tamaño*, que hace que este DNA sea fácil de aislar y manipular; (2) su *origen de replicación independiente*, de manera que la replicación del plásmido en la célula ocurre independientemente del control directo del cromosoma; (3) su *número múltiple de copias*, de manera que en la célula pueden estar presentes varias o numerosas copias, lo que posibilita la amplificación del DNA, y (4)la presencia de *marcadores seleccionables*, tales como genes de resistencia a antibióticos, haciendo así más fácil la detección y selección de los clones que contienen el plásmido.

Aunque en el ambiente natural los plásmidos conjugativos se transfiren generalmente por contacto célula a célula, los plásmidos vectores de clonación han sido modificados a fin de evitar su transferencia por conjugación y así lograr su contención biológica. Sin embargo, en el laboratorio es posible realizar la transferencia por transformación o electroporación (*véase* Sección 10.6). Dependiendo del sistema hospedador-plásmido, la replicación del plásmido puede estar bajo un estricto control celular, en cuyo caso sólo se hacen algunas copias, o bajo un control celular relajado, en cuyo caso se produce un gran número de copias. A menudo, conseguir un número de copias alto es importante en la clonación de genes, y, mediante una adecuada selección del sistema hospedador-plásmido y una manipulación de la síntesis celular de las macromoléculas, se pueden conseguir varios miles de copias del plásmido por célula.

El Plásmido pBR322

En la Sección 10.9, comentamos cómo el plásmido F podía obtener genes del cromosoma de *Escherichia coli in vivo*, originando los plásmidos F'. Por tanto, uno podría imaginar la utilización de F *in vitro*. Sin embargo, el plásmido F es demasiado grande (casi 100 kb, *véase* Figura 10.17) para resultar útil, y no tiene marcadores fácilmente seleccionables. Incluso así, los primeros vectores de clonación plasmídicos utilizados eran plásmidos naturales. Sin embargo, éstos fueron reemplazados pronto por plásmidos resultantes de manipulaciones *in vitro*. Un ejemplo de estos plásmidos modificados utilizados como vectores de clonación es pBR322, que se replica en *Escherichia coli* (Figura 10.41). El plásmido pBR322 tiene un número de características que lo hacen adecuado como vector de clonación.

1. Es relativamente pequeño, sólo 4361 pares de bases.
2. Se mantiene de forma estable en su hospedador (*Escherichia coli*) en un número de copias relativamente alto, 20-30 copias por célula.
3. Puede ser amplificado hasta un número elevado (1000-3000 copias por célula, aproximadamente el 40% del genoma) por inhibición de la síntesis proteica mediante la adición de cloranfenicol.
4. Es fácil de aislar en la forma superenrollada usando diversas técnicas sencillas.
5. Se puede insertar en él una cantidad razonable de DNA foráneo, aunque los insertos de más de 10 kb lo convierten en inestable.
6. Se conoce la secuencia completa de bases de este plásmido, lo que permite localizar sitios en los que pueden actuar las enzimas de restricción.

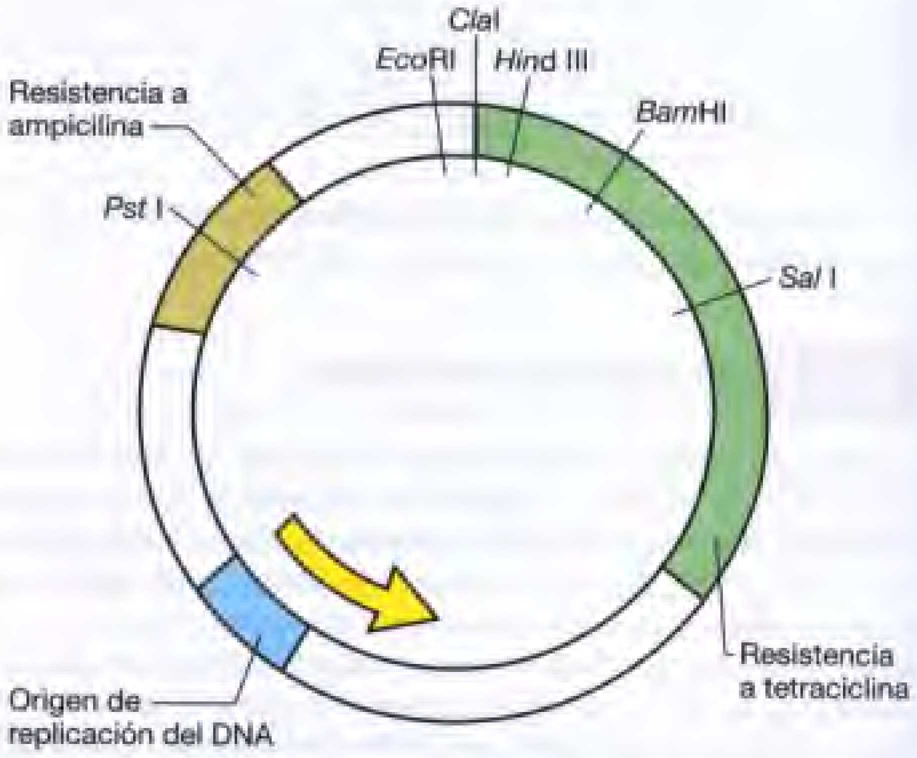


Figura 10.41 Estructura del plásmido pBR322, uno de los primeros y más utilizados vectores de clonación, mostrando las características esenciales. La flecha indica la dirección de la replicación del DNA a partir del origen.

7. Existen sitios *únicos* de corte para varias enzimas de restricción tales como *Pst*I, *Sal*I, *Eco*RI, *Hin*dIII y *Bam*H1. Es importante disponer de un solo sitio de reconocimiento para al menos una enzima de restricción, porque así el tratamiento con esta enzima permite linearizar el plásmido sin que pierda ningún fragmento.
8. Posee un gen responsable de la resistencia a ampicilina y otra que confiere resistencia a tetraciclina. Estos genes permiten seleccionar fácilmente los transformantes que contienen el plásmido. Los sitios reconocidos por algunas de las enzimas de restricción están dentro de uno u otro de estos genes de resistencia, facilitando la identificación de los plásmidos que llevan el DNA clonado (*véase* más adelante).
9. Puede ser fácilmente introducido en las células por transformación.

El uso del plásmido pBR322 en la clonación de genes se muestra en la Figura 10.42. Como hemos visto, el sitio *Bam*H1 está dentro del gen de resistencia a tetraciclina y el sitio *Pst*I está dentro del gen de resistencia a la ampicilina. Si el DNA extraño se inserta en uno de estos sitios, se perderá la resistencia al antibiótico conferida por el gen que contiene ese sitio, un fenómeno conocido como **inactivación insercional**. La inactivación insercional se usa para detectar la presencia del DNA clonado dentro del plásmido. Así, cuando pBR322 se digiere con *Bam*HI y se liga a DNA extraño, y luego se aislan los clones bacterianos transformados, aquellos clones que sean resistentes a ampicilina y tetraciclina *carecerán* de DNA extraño (el plásmido incorporado en estas células representa DNA del vector que se ha reciclado sin incorporar el DNA exógeno). Sin embargo, las céluas que son todavía *resistentes* a ampicilina pero *sensibles* a tetraciclina *contienen* el plásmido con DNA exógeno incorporado. Puesto que la resistencia a ampicilina y la resistencia a tetraciclina pueden determinarse independientemente en placas de agar, resulta fácil aislar bacterias que contengan los clones deseados y eliminar las células que no contengan el plásmido.

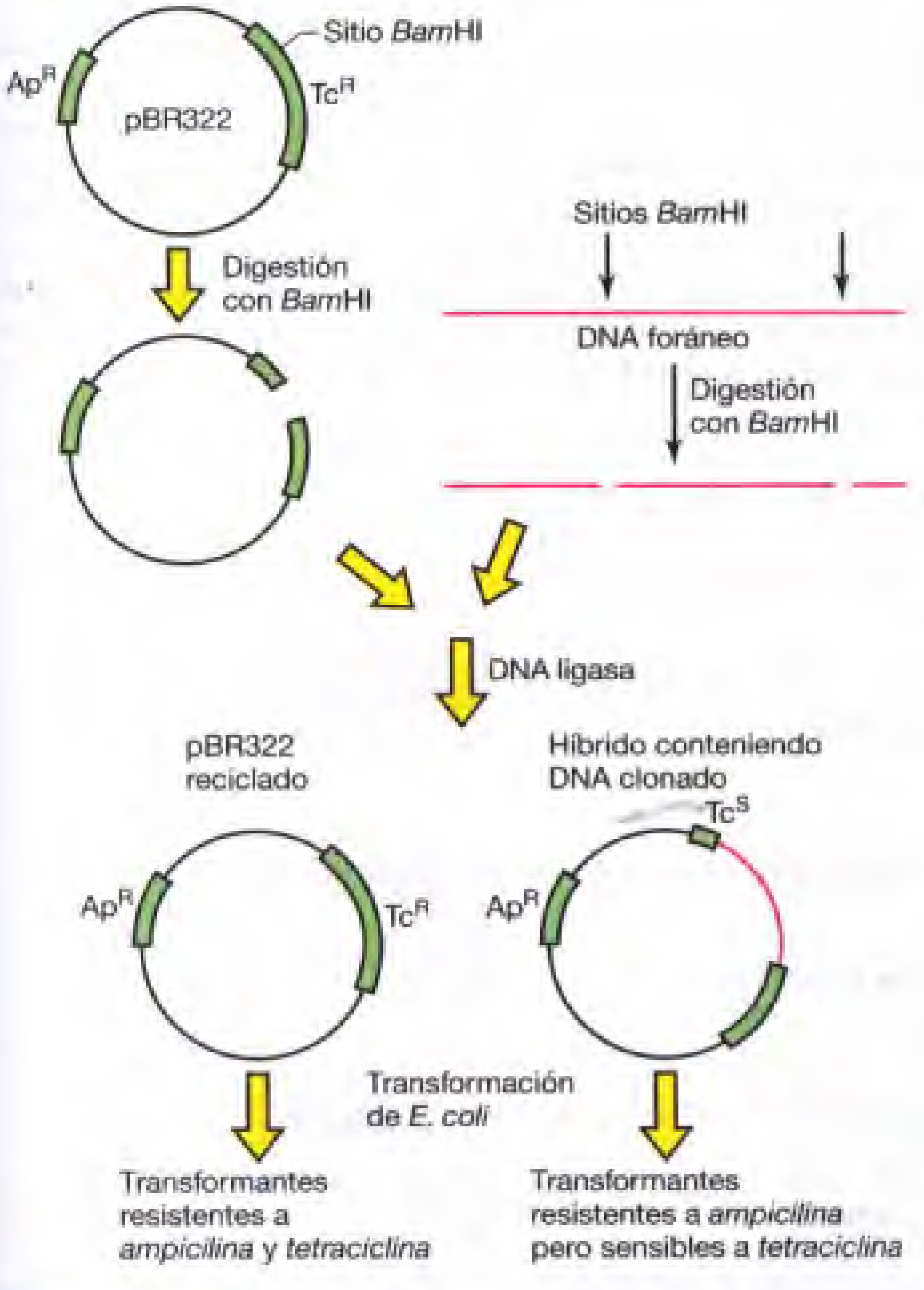

Sitio *Bam*HI
Ap^R
pBR322
Tc^R
Digestión con *Bam*HI
Sitios *Bam*HI
DNA foráneo
Digestión con *Bam*HI
DNA ligasa
pBR322 reciclado
Híbrido conteniendo DNA clonado
Tc^S
Ap^R
Tc^R
Ap^R
Transformación de *E. coli*
Transformantes resistentes a *ampicilina* y *tetraciclina*
Transformantes resistentes a *ampicilina* pero sensibles a *tetraciclina*

Figura 10.42 El uso del plásmido pBR322 como vector de clonación, mostrando cómo la inserción de DNA foráneo causa la inactivación del gen de la resistencia a tetraciclina, y permitiendo la inmediata identificación de transformantes que contengan el fragmento de DNA clonado.

El plásmido pBR322 representa una generación temprana de vectores de clonación construidos *in vitro*. Existen ahora nuevas generaciones de vectores plasmídicos que se han construido de manera que posean características más útiles y que son más sencillos de manejar. Estas nuevas características casi siempre incluyen un **sitio de clonación múltiple** (**polylinker**), un segmento corto de DNA con muchos sitios de restricción diferentes, cada uno de ellos único en el vector. Este sitio de clonación múltiple suele estar contenido en la región codificante de un gen cuya inactivación insercional es fácil de seguir. Tales características se encuentran también en los vectores de bacteriófagos, y un ejemplo específico se muestra en la Sección 15.1. Algunas veces la inactivación insercional puede utilizarse como selección positiva. Por ejemplo, hay un protocolo que permite la selección de bacterias que han perdido la resistencia a tetraciclina. En algunos de los vectores desarrollados recientemente, el gen que lleva el sitio de clonación múltiple produce normalmente una proteína que es letal para el hospedador. Por tanto, sólo podrán crecer las células en las que este gen haya sido *inactivado*.

La clonación en plásmidos es un procedimiento versátil y bastante habitual, de uso generalizado en ingeniería genética, particularmente cuando el fragmento a clonar es relativamente pequeño. Los plásmidos se usan con frecuencia como vectores de clonación si se desea que el gen clonado se *exprese* (*véase* Sección 31.4).

✓ 10.15 Revisión de conceptos

Los plásmidos son vectores de clonación útiles porque son fáciles de aislar y purificar, y son capaces de multiplicarse en un número de copias alto, en las células bacterianas. Los genes de resistencia a los antibióticos de los plásmidos se utilizan para identificar las células bacterianas que contengan el plásmido.

✓ Explique por qué es mejor utilizar una enzima de restricción que corte el plásmido vector sólo una vez.

✓ ¿Qué es la *inactivación insercional*?

10.16 El bacteriófago lambda como vector de clonación

Recuérdese que durante la transducción especializada (*véase* Sección 10.7) algunos genes del hospedador se incorporan en el genoma del bacteriófago. Un fago que se utiliza como fago especializado en la transducción es el bacteriófago lambda (*véase* Sección 9.10). Durante la transducción especializada, el fago lambda actúa como un vector, pero la recombinación tiene lugar en la célula, no en el tubo de ensayo. Sin embargo, lambda puede utilizarse como un vector de clonación para la recombinación *in vitro*. Es un vector de clonación particularmente útil porque se conoce bien su genética molecular, puede retener más DNA que la mayoría de los plásmidos, y el DNA puede ser eficientemente empaquetado *in vitro* dentro de las partículas de fago. Estas pueden utilizarse para infectar células hospedadoras, y la infección es mucho más eficiente que la transformación (transfección). Lambda tiene un mapa genético complejo (*véase* Figura 9.18) y un gran número de genes. Resulta particularmente importante para su uso como vector que la porción central del genoma de lambda, entre los genes *J* y *N*, no es esencial y puede ser reemplazado con DNA foráneo.

Fagos lambda modificados

La estirpe silvestre del fago lambda no es adecuada como vector de clonación porque tiene demasiados sitios para las enzimas de restricción. Para evitar esta dificultad, se han construido fagos lambda modificados. En un tipo de fagos lambda modificados, los llamados fagos Charon, se han eliminado los sitios de restricción no deseados por mutación puntual, deleción o sustitución. En variantes que tienen solamente un único sitio de restricción, puede *insertarse* una pieza de DNA, mientras que en las variantes con dos sitios, el DNA exógeno puede *reemplazar* a un segmento específico del DNA de lambda. Estas últimas variantes, llamadas **vectores de reemplazamiento**, son especialmente útiles para la clonación de fragmentos grandes de DNA.

La Figura 10.43 muestra alguno de los caracteres esenciales de lambda silvestre y de dos vectores Charon. Mientras que lambda tipo silvestre contiene cinco sitios *Eco*RI, Charon 4A contiene tres y Charon 16 solamente uno. Charon 4 se usa como vector de reemplazamiento; los dos pequeños fragmentos internos son cortados y descartados durante la clonación. Con Charon 16, el DNA que va a clonarse se inserta en el único sitio *Eco*RI. Tanto Charon 4A como Charon 16 contienen deleciones (no mostradas en la figura) que no sólo eliminan algunos sitios que se encuentran en el fago lambda tipo silvestre sino que hacen el genoma más pequeño. Esto permite la clonación de fragmentos más grandes de DNA.

Ambos vectores también contienen mutaciones por sustitución, que se muestran en la Figura 10.43. Una de las sustituciones es el gen de la β-galatosidasa. Cuando los vectores se replican en una cepa lactosa negativa (Lac$^-$) de *Escherichia coli*, se sintetiza β-galactosidasa a partir del gen del fago y la presencia de placas lactosa positivas (Lac$^+$) puede detectarse utilizando un agar con indicador de color (*véase* Sección 15.1). Si un gen foráneo se inserta dentro del gen de la β-galactosidasa, el carácter Lac$^+$ se pierde. Tales placas Lac$^-$ pueden detectarse fácilmente como placas incoloras en un fondo de placas coloreadas.

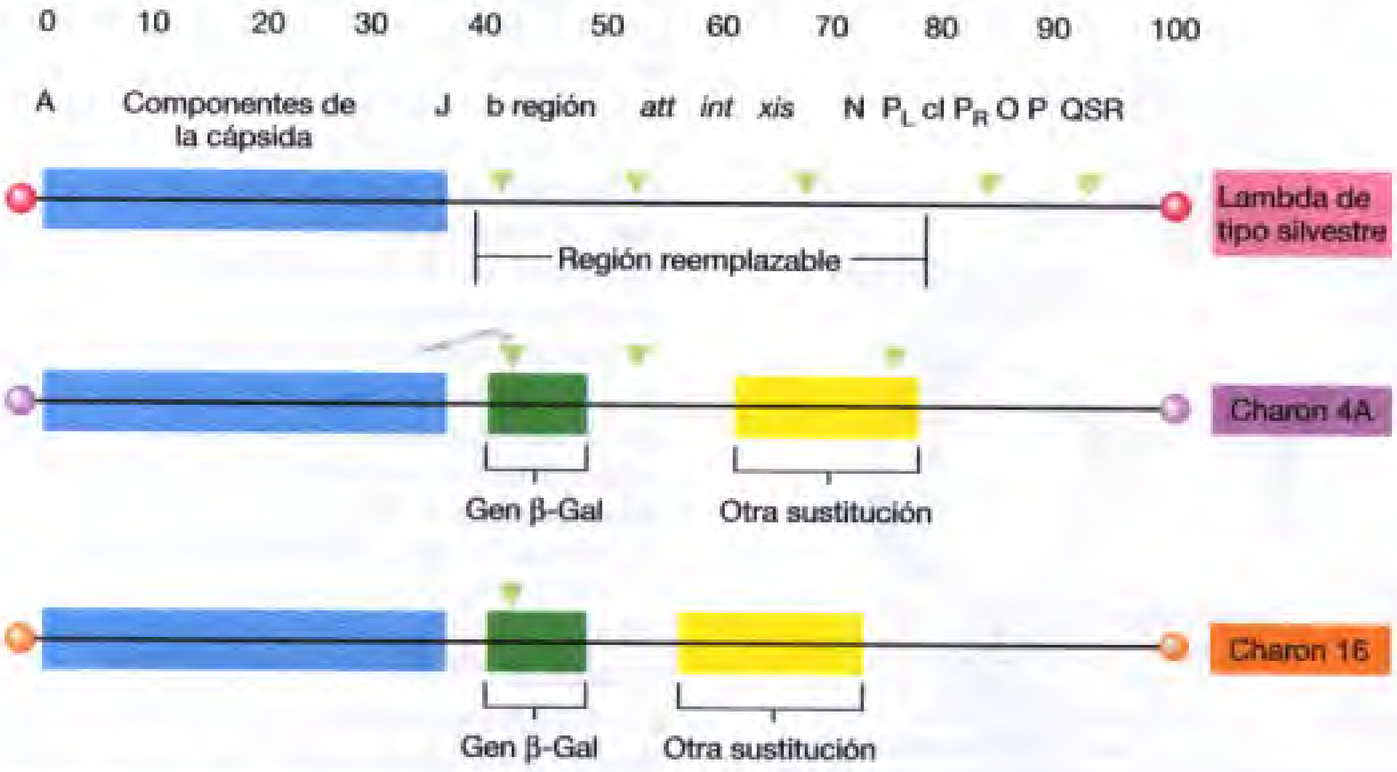


Figura 10.43 Clonación molecular con el fago lambda. Mapa genético abreviado del bacteriófago lambda, mostrando los extremos cohesivos como círculos (véase Figura 9.18. Charon A4 y 16 son derivados de lambda que tienen varias sustituciones y deleciones en la región que no es esencial. Una de las sustituciones en cada caso es un gen (β-Gal) que codifica la enzima β-galactosidasa, la cual permite detectar los clones que contienen este fago. Mientras que el genoma de tipo silvestre de lambda es de 48,5 kilopares de bases, el de Charon 4A es de 45,4 y el de Charon 16 es de 41,7 kilopares de bases. Las flechas (▼), que se muestran encima de cada uno de los mapas, indican los sitios reconocidos por la enzima de restricción *Eco*RI.

Pasos en la clonación con el fago lambda

La clonación con vectores lambda de reemplazamiento implica los pasos siguientes (Figura 10.44):

1. Aislamiento del DNA del vector a partir de partículas de fago y digestión con una enzima de restricción apropiada.

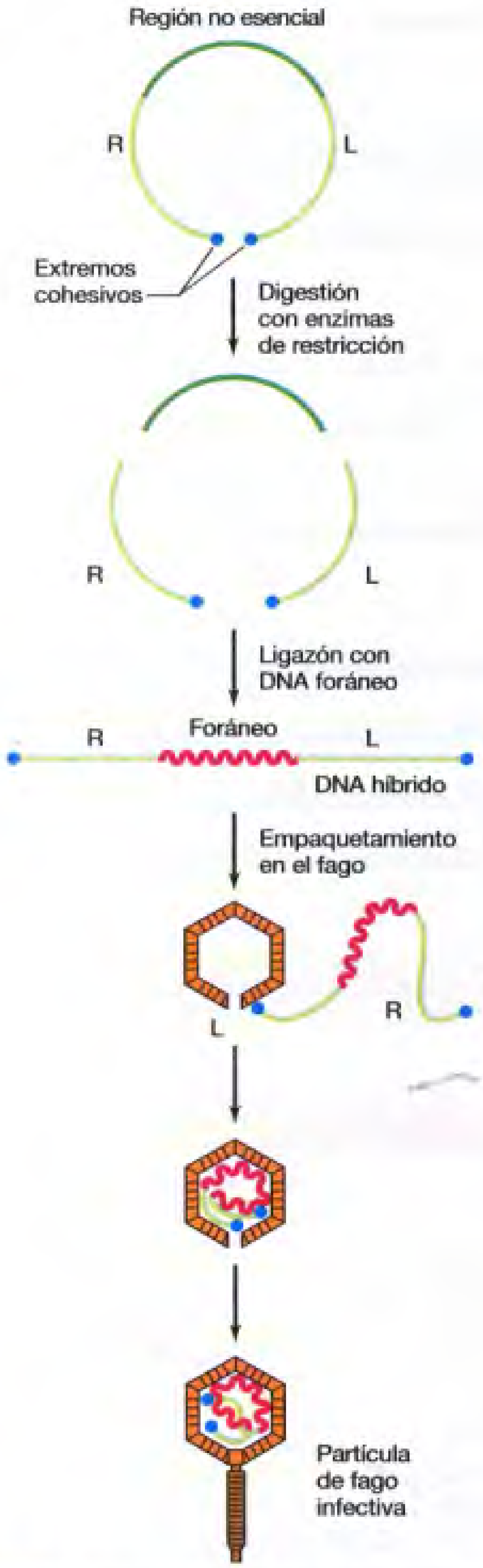

Región no esencial
R
L
Extremos cohesivos
Digestión con enzimas de restricción
R
L
Ligazón con DNA foráneo
R
Foráneo
L
DNA híbrido
Empaquetamiento en el fago
L
R
Partícula de fago infectiva

Figura 10.44 El uso del bacteriófago lambda como vector de clonación. (Para detalles, *véase* el texto).

2. Ligazón de los dos fragmentos de lambda con fragmento de DNA foráneo usando DNA ligasa. Se escogen las condiciones para que se formen moléculas de una longitud adecuada que permita su empaquetamiento en las partículas de fago.
3. Empaquetamiento del DNA, añadiendo extractos de fago que contengan las proteínas de la cabeza y de la cola, y permitan la formación de partículas de fago viables.
4. Infección de *Escherichia coli* y aislamiento de clones de fago, recogiendo las placas de lisis generadas por una cepa hospedadora.
5. Detección del DNA clonado en el fago recombinante, mediante hibridación de ácidos nucleicos u observación de propiedades genéticas.

La selección de recombinantes es menos problemática cuando se utilizan vectores lambda de reemplazamiento (como Charon 4A) que cuando se utilizan plásmidos, porque, (1) la eficiencia de la transferencia de DNA recombinante a la célula por lambda es muy alta, y (2) los fragmentos de lambda que no han recibido nuevo DNA son demasiado pequeños para ser incorporados dentro de las partículas de fago.

Aunque lambda es un vector de clonación útil, existen límites en cuanto a la cantidad de DNA que se puede insertar. La viabilidad de las partículas de fago es baja si el DNA es mayor que el 105% del DNA de lambda normal, y algunos genes de lambda no pueden eliminarse sin que se pierda parte de la capacidad del vector para replicarse. Por tanto, no es posible clonar de forma eficiente fragmentos grandes de DNA (mayores de 20 kb).

Cósmidos

Un tipo de vector relacionado, que utiliza genes específicos de lambda, es el llamado **cósmido.** Los cósmidos son vectores plasmídicos que contienen DNA foráneo y el sitio *cos* (extremo cohesivo) procedente del genoma de lambda. Los sitios *cos* se requieren para empaquetar el DNA dentro de los viriones de lambda. Los cósmidos se construyen a partir de plásmidos que contengan DNA clonado, ligando la región *cos* de lambda al DNA del plásmido. El plásmido modificado puede ahora empaquetarse *in vitro* dentro de viriones de lambda, como se ha descrito anteriormente, y las partículas de fago pueden utilizarse para transducir *Escherichia coli*. La construcción de cósmidos evita la necesidad de tener que transformar *E. coli*, cosa que en el mejor de los casos es un proceso ineficiente (*véase* Sección 10.6).

Una de las principales ventajas de los cósmidos es que pueden utilizarse para clonar grandes fragmentos de DNA. De esta manera, se necesitan menos clones para obtener una representación de todo el elemento genético. Los cósmidos también permiten almacenar el DNA en partículas de fagos en lugar de en plásmidos. Las partículas de fago son mucho más estables que los plásmidos, de modo que el DNA recombinante puede guardarse durante largos periodos de tiempo.

✓ 10.16 Revisión de conceptos

Algunos bacteriófagos, tal como lambda, han sido modificados para convertirlos en vectores de clonación útiles. Con lambda se pueden clonar mayores cantidades de DNA foráneo que con muchos plásmidos. Además, el DNA recombinante puede ser empaquetado *in vitro* para su eficiente transferencia a la célula hospedadora. Los vectores plasmídicos que contienen los sitios *cos* de lambda se llaman cósmidos, y pueden transportar un gran fragmento de DNA extraño.

- ✓ ¿Por qué es útil la posibilidad de empaquetar DNA recombinante en un tubo de ensayo?
- ✓ ¿Qué es un *vector de reemplazamiento*?

10.17 Amplificación del DNA: la reacción en cadena de la polimerasa

Los métodos convencionales de clonación molecular pueden considerarse como herramientas para la amplificación del DNA *in vivo*. Sin embargo, el desarrollo del DNA sintético ha originado un nuevo método para la amplificación rápida del DNA *in vitro*, la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**. La reacción en cadena de la polimerasa puede multiplicar moléculas de DNA hasta miles de millones de veces en el tubo de ensayo, proporcionando grandes cantidades de genes para su clonación, secuenciación o mutagénesis. La PCR hace uso de la *DNA polimerasa* que copia moléculas de DNA (*véase* Sección 7.5).

La técnica de la PCR requiere que se conozca la secuencia nucleotídica de una región del gen deseado. Esto es necesario porque para que funcione la PCR es necesario disponer de oligonucleótidos *iniciadores* cortos, complementarios de secuencias presentes en el gen o genes de interés. Las etapas de amplificación del DNA en la PCR son las siguientes:

1. En un sintetizador de nucleótidos se fabrican los dos oligonucleótidos iniciadores que flanquean el DNA diana (Figura 10.45*a*), y se añaden en gran exceso al DNA diana desnaturalizado por calor.
2. Cuando se ha enfriado la mezcla, el exceso de iniciadores relativos al DNA diana asegura que la mayor parte de las cadenas diana hibriden con iniciadores y no entre sí (Figura 10.45*a*).

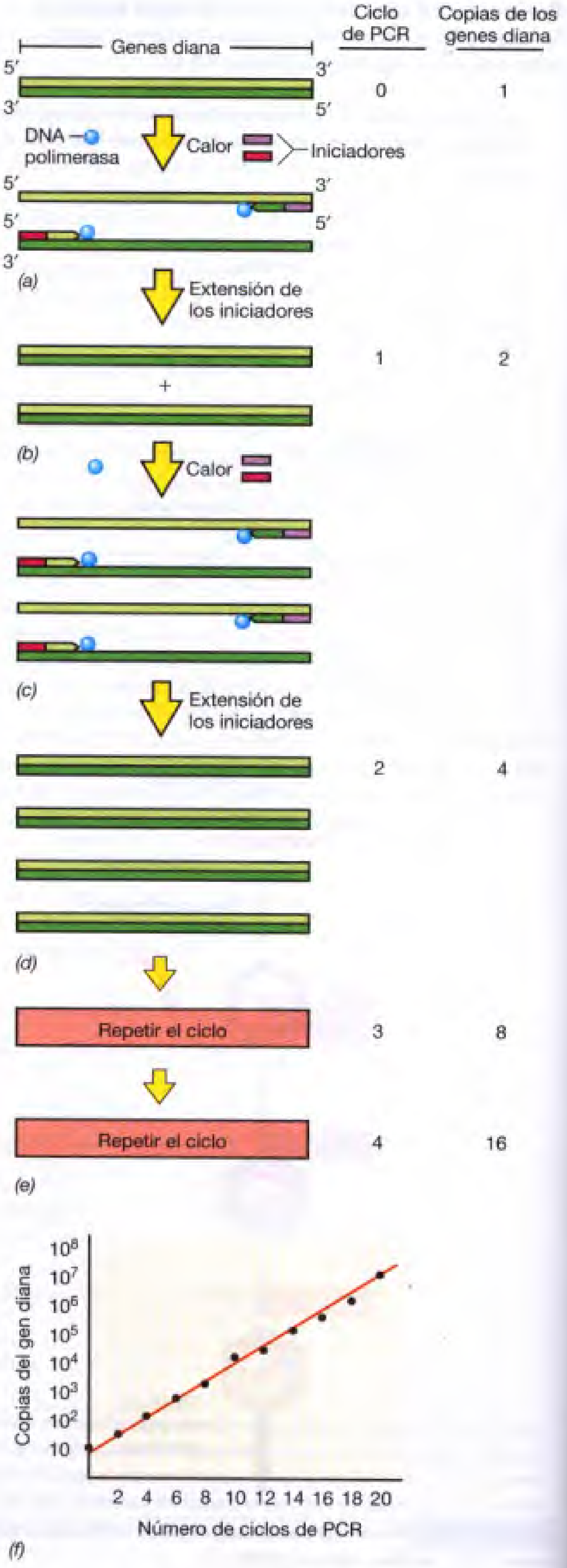


Figura 10.45 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de secuencias específicas de DNA. (a) El DNA diana se calienta para separar las cadenas y, junto a la DNA polimerasa, se añade un gran exceso de dos oligonucleótidos iniciadores, uno complementario a la cadena diana del DNA y otro a la cadena complementaria. (b) Una vez hibridado el iniciador, la extensión de éste proporciona una copia del DNA bicatenario original. (c) Un posterior calentamiento, hibridación y extensión del iniciador, proporcionan un segundo DNA bicatenario. (d) El segundo DNA de doble cadena. (e) Dos ciclos adicionales de PCR rinden 8 y 16 copias, respectivamente, de la secuencia del DNA original. (f) Efecto de haber corrido 20 ciclos de PCR sobre una preparación que contenía originalmente 10 copias del gen diana. Observe que la gráfica es semilogarítmica.

3. La DNA polimerasa alarga los iniciadores usando las bandas diana como moldes (Figura 10.45*b*).
4. Después de un periodo de incubación adecuado, se calienta de nuevo la mezcla para separar las cadenas. Luego se enfría la mezcla para permitir que los iniciadores se hibriden con las regiones complementarias del DNA recién sintetizado, y se repite todo el proceso (Figura 10.45*c*-*e*).

Así, cada «ciclo» de PCR implica las siguientes etapas: (1) desnaturalización por calor del DNA bicatenario diana, (2) enfriamiento para permitir el acoplamiento de iniciadores específicos con el DNA diana, y (3) extensión de los iniciadores por la DNA polimerasa (Figura 10.45). Nótese que en la Figura 10.45 cómo los productos de la extensión de un iniciador pueden servir de molde para el otro iniciador en el siguiente ciclo. La elegancia de la PCR reside en el hecho de que cada ciclo *duplica* literalmente el contenido original del DNA diana. En la práctica, suelen hacerse unos 20-30 ciclos, lográndose así incrementar la secuencia diana entre 10^6 y 10^9 veces (Figura 10.45*f*).

PCR a temperatura elevada

La técnica de la PCR original empleaba DNA polimerasa de *Escherichia coli*, pero debido a las altas temperaturas necesarias para desnaturalizar las copias bicatenarias del DNA, la propia polimerasa se desnaturalizaba y había que reponerla en cada ciclo. Esto obligaba a limitar el número de ciclos que se podían realizar y resultaba muy caro. Este problema se resolvió al utilizar una DNA polimerasa estable aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*. La DNA polimerasa de *T. aquaticus*, conocida como *Taq polimerasa*, es estable a 95°C y, por tanto, no se ve afectada por la etapa de desnaturalización empleada en la reacción de la PCR. El uso de la *Taq* polimerasa también incrementó la especificidad de la reacción de la PCR, ya que el DNA es copiado a 72°C en lugar de a 37°C. A altas temperaturas, raramente ocurre la hibridación inespecífica de los iniciadores con el DNA no diana, por lo que el producto de la *Taq* PCR es más homogéneo que el obtenido utilizando la enzima de *E. coli*.

Un problema de la *Taq* polimerasa es que no posee función correctora (*véase* Sección 7.6) y, en consecuencia, comete más faltas que la enzima de *Escherichia coli*. La DNA polimerasa de la arquea hipertermofílica *Pyrococcus furiosus* (temperatura óptima de crecimiento, 100°C) (*véanse* Secciones 6.10 y 13.6), llamada *Pfu* polimerasa (o «vent polimerasa»), también es utilizada ampliamente, y es incluso más termoestable que la *Taq* polimerasa. La *Pfu* polimerasa tiene actividad correctora, lo que la convierte en una enzima particularmente buena cuando la precisión es crucial.

Debido al número de pasos altamente repetitivos inherentes a la técnica de la PCR, se han desarrollado máquinas que pueden ser programadas para realizar automáticamente los ciclos de calentamiento y enfriamiento. Dado que cada ciclo requiere solamente unos 5 minutos, el procedimiento automatizado permite realizar grandes amplificaciones en sólo algunas horas (por el contrario, una amplificación semejante realizada por los métodos de clonación *in vivo* necesitaría varios días). Para cubrir la demanda de DNA polimerasa termoestable en los mercados crecientes de la PCR y secuenciación de DNA, los genes que codifican estas enzimas se han clonado en *E. coli* y se producen en grandes cantidades; el coste del método de la PCR es ahora una fracción de lo que fue cuando se introdujo esta técnica inicialmente.

Aplicaciones de la PCR

La PCR es una poderosa herramienta porque es de manejo simple, extremadamente específica, y extremadamente eficiente. Recuérdese que la cantidad de producto se *duplica* en cada etapa de amplificación, produciéndose un incremento exponencial. Esto significa que sólo se necesita que estén presentes en la mezcla unas cuantas moléculas del DNA diana para comenzar la reacción. La reacción es tan específica que con iniciadores de 15 nucleótidos y altas temperaturas de anillamiento, los niveles de falsos apareamientos son extremadamente bajos y, en consecuencia, el producto formado debe ser relativamente homogéneo.

Aunque las máquinas de termociclado automatizado son más bien caras, la técnica ha alcanzado un amplio espectro de aplicaciones porque lo que puede hacerse con la PCR (y el análisis del producto amplificado) permite realizar en tan sólo algunas horas lo que anteriormente habría requerido unos días o incluso semanas a un laboratorio entero. Por tanto, la PCR puede ser extremadamente eficiente en términos de coste y se utiliza actualmente en un amplio número de aplicaciones prácticas.

La PCR es extremadamente útil para obtener DNA para la clonación y secuenciación, ya que el gen o genes de interés pueden amplificarse fácilmente si se conocen las secuencias flanqueantes. Como los iniciadores utilizados no tienen que ser completamente complementarios, la PCR se usa rutinariamente en estudios comparativos o evolutivos para amplificar genes de una variedad de fuentes donde el DNA ya ha sido clonado (y secuenciado) a partir de un organismo. En estos casos, los iniciadores se diseñan para regiones del gen que se cree que se han conservado a través de una gran variedad de organismos. Debido a su sensibilidad, la PCR se ha utilizado para amplificar y clonar DNA de fuentes tales como los restos de humanos modificados e incluso muestras de animales o plantas ya extinguidos.

La PCR se puede utilizar también para amplificar cantidades muy pequeñas de DNA presentes en una muestra. Usando iniciadores adecuados, es posible encontrar e identificar una sola célula bacteriana en una muestra incluso en presencia de un gran número de otras especies. Nótese, que cuando se amplifica el DNA de una bacteria no es necesario crecer el organismo en el laboratorio. Por tanto, la PCR es una de las herramientas más efectivas para revelar a los científicos la enorme diversidad del mundo microbiano y dejar claro que los microorganismos que han sido cultivados representan una ínfima fracción de todos los microorganismos presentes en la naturaleza (*véase* Sección 18.5). Debido a esta capacidad de amplificar y analizar DNA sin necesidad de crecer los microorganismos, la PCR ha alcanzado un importante valor en el diagnóstico microbiológico (*véase* Sección 24.13). La PCR se ha utilizado también en la huella dactilar del DNA (Recuadro «Huella de DNA», Capítulo 31), una poderosa herramienta forénsica que permite la identificación de individuos, o relaciones entre individuos, a partir de muy pequeñas muestras de sus DNAs. La PCR puede acoplarse a la transcripción reversa en un proceso llamado RT-PCR. Esto puede ser muy útil cuando uno quiere producir grandes cantidades de DNA usando RNA como molde.

✓ 10.17 Revisión de conceptos

La reacción en cadena de la polimerasa, un procedimiento para amplificar DNA *in vitro*, hace uso de la DNA polimerasa estable al calor de procariotas termofílicos. El calor se utiliza para desnaturalizar el DNA en dos moléculas monocatenarias, cada una de las cuales es copiada por la polimerasa. A partir de un pequeño oligonucleótido que actúa de iniciador para amplificar el DNA diana, la polimerasa copia el DNA completo al que se asocia el iniciador. Tras un único ciclo de copia, las dobles cadenas formadas se separan de nuevo mediante el calor, y se permite un nuevo ciclo de copia. Tras cada ciclo termal la cantidad de DNA diana se duplica.

- ✓ ¿Por qué la PCR requiere iniciadores?
- ✓ ¿Por qué se necesita un iniciador para cada «extremo» del DNA que se va a amplificar?

10.18 Mutagénesis *in vitro* y dirigida

Los métodos de la manipulación de DNA *in vitro* han abierto todo un nuevo campo de la mutagénesis. Mientras los mutágenos convencionales (*véase* Sección 10.3) actúan al azar, mediante el uso de DNA sintético y las técnicas del DNA recombinante es posible introducir mutaciones en *sitios determinados con total precisión* en los genes. Este proceso se denomina **mutagénesis dirigida**. Es de esperar que las proteínas fabricadas por las cepas que lleven estas mutaciones tengan propiedades diferentes de las proteínas del tipo silvestre, propiedades que, en ciertos casos, pueden predecirse a partir del conocimiento de la estructura de la proteína.

Mutagénesis dirigida

Los primeros protocolos de mutagénesis dirigida incluían el tratamiento de bacteriófagos transductantes con mutágenos químicos, seguido de la infección de la bacteria y del análisis de los mutantes. Tal estrategia tenía el efecto de incrementar la velocidad de mutación en una región limitada del genoma. Actualmente, se dispone de nuevas técnicas que permiten al investigador mucha mayor especificidad: un par de bases de un gen pueden cambiarse a otro par de bases. Algunas de las técnicas son simples y muy poderosas.

El procedimiento básico es sintetizar un corto oligodesoxinucleótido que contenga el cambio de bases deseado y dejar que hibride con un DNA monocatenario que contenga el gen de interés. El apareamiento es completo excepto en la pequeña región del cambio de bases. Entonces el fragmento monocatenario corto del oligonucleótido sintético se extiende usando la DNA polimerasa, copiando de este modo el resto del gen. La molécula bicatenaria obtenida se introduce en un transformante y se seleccionan los mutantes por un procedimiento ya descrito (*véase* Sección 10.6). El mutante obtenido se utiliza después en la producción de la proteína modificada (mutante).

Un procedimiento completo de *mutagénesis dirigida* se ilustra en la Figura 10.46. Puede ser conveniente comenzar con el gen de interés clonado en un vector de DNA monocatenario. Un vector ampliamente utilizado para la mutagénesis dirigida es el bacteriófago M13 (*véase* Sección 16.5).

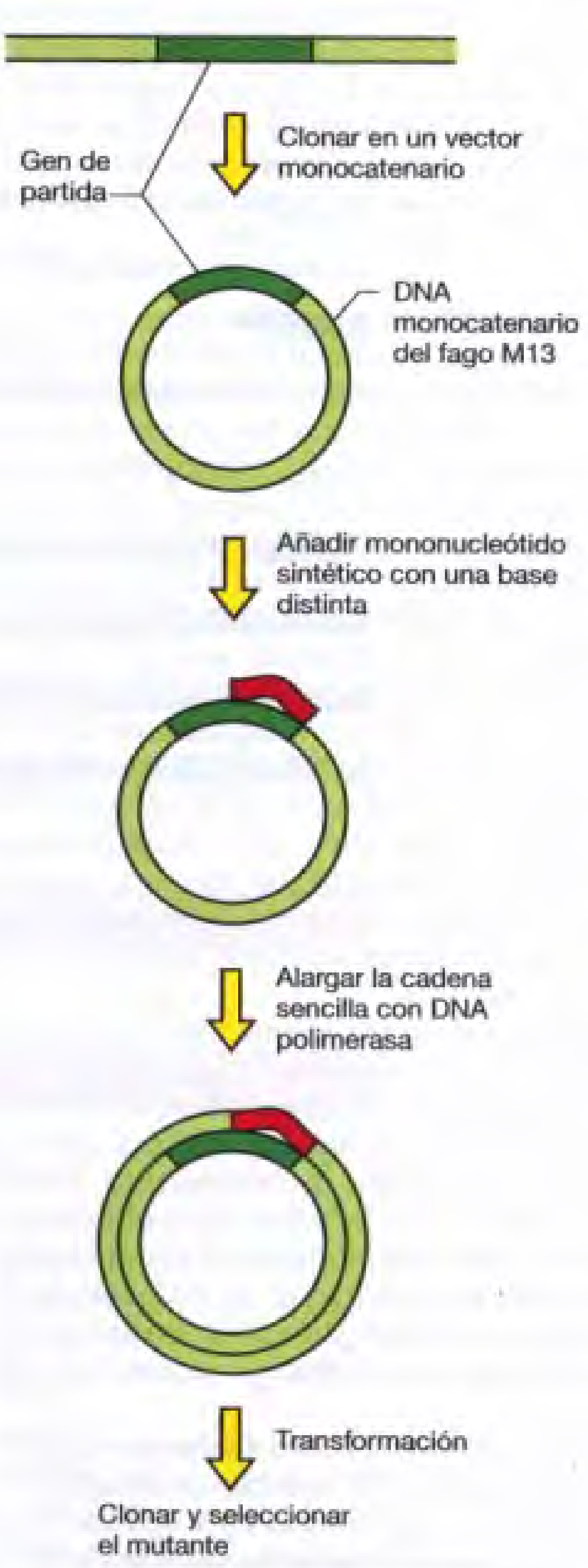

Gen de partida
Clonar en un vector monocatenario
DNA monocatenario del fago M13
Añadir mononucleótido sintético con una base distinta
Alargar la cadena sencilla con DNA polimerasa
Transformación
Clonar y seleccionar el mutante

Figura 10.46 Mutagénesis dirigida usando fragmentos cortos de oligodeoxirribonucleótido sintético.

Discutiremos el bacteriófago M13 como vector en el Capítulo 15.

Mutagénesis con casete e interrupción génica

Generalmente, debido al gran número de enzimas de restricción comercialmente disponibles y, por tanto, el gran número de diferentes secuencias de DNA que pueden ser cortadas, es posible encontrar varios sitios de restricción diferentes en el gen de interés. Si no se encuentra ningún sitio en el gen para la enzima adecuada, o no está en la localización requerida, es posible añadir estos sitios mediante mutagénesis dirigida (*véase* Figura 10.46). Si los sitios de restricción están muy próximos, el fragmento de DNA que está entre ellos puede cortarse y separarse, y luego sustituirse por un fragmento de DNA sintético en el cual se han cambiado una o más bases. Estos fragmentos sintéticos se llaman *casetes* y el proceso se conoce como **mutagénesis con casete**.

La inserción de mutaciones puede también generarse insertando simplemente un casete en un solo sitio. Cuando se usan casetes para reemplazar secciones de genes, los casetes son por lo general del mismo tamaño que los fragmentos de DNA del tipo silvestre. Sin embargo, el casete utilizado para obtener mutaciones por inserción puede ser casi de cualquier tamaño, e incluso puede ser un gen completo. De hecho, suelen utilizarse casetes que codifican proteínas que confieren resistencia a un determinado antibiótico en el transformante. Este tipo de mutagénesis con casete se usa en un proceso llamado **interrupción (disrupción) génica**. El proceso de disrupción génica se ilustra en la Figura 10.47. En este caso, un fragmento que lleva un gen que confiere resistencia a kanamicina, el casete *kan*, se inserta en un sitio de restricción en un gen clonado. El vector que lleva este gen mutante es linearizado luego mediante un corte con una enzima de restricción, y el DNA lineal se usa para transformar un hospedador y selecciona para resistencia a kanamicina. El plásmido linearizado no puede replicarse, de manera que las células resistentes surgirán por recombinación homóloga (*véase* Sección 10.5) entre el gen mutado que está en el plásmido y el gen silvestre presente en el cromosoma.

Las células no solamente han adquirido la resistencia a kanamicina, sino que también han perdido la función del gen en el cual se insertó el casete *kan*. Por ello, estas mutaciones se llaman también mutaciones «*knockout*». Este proceso es similar a la búsqueda de mutaciones por inserción hechas por transposones (*véase* Sección 10.11), pero en este caso el genético escoge exactamente qué gen recibirá la mu-

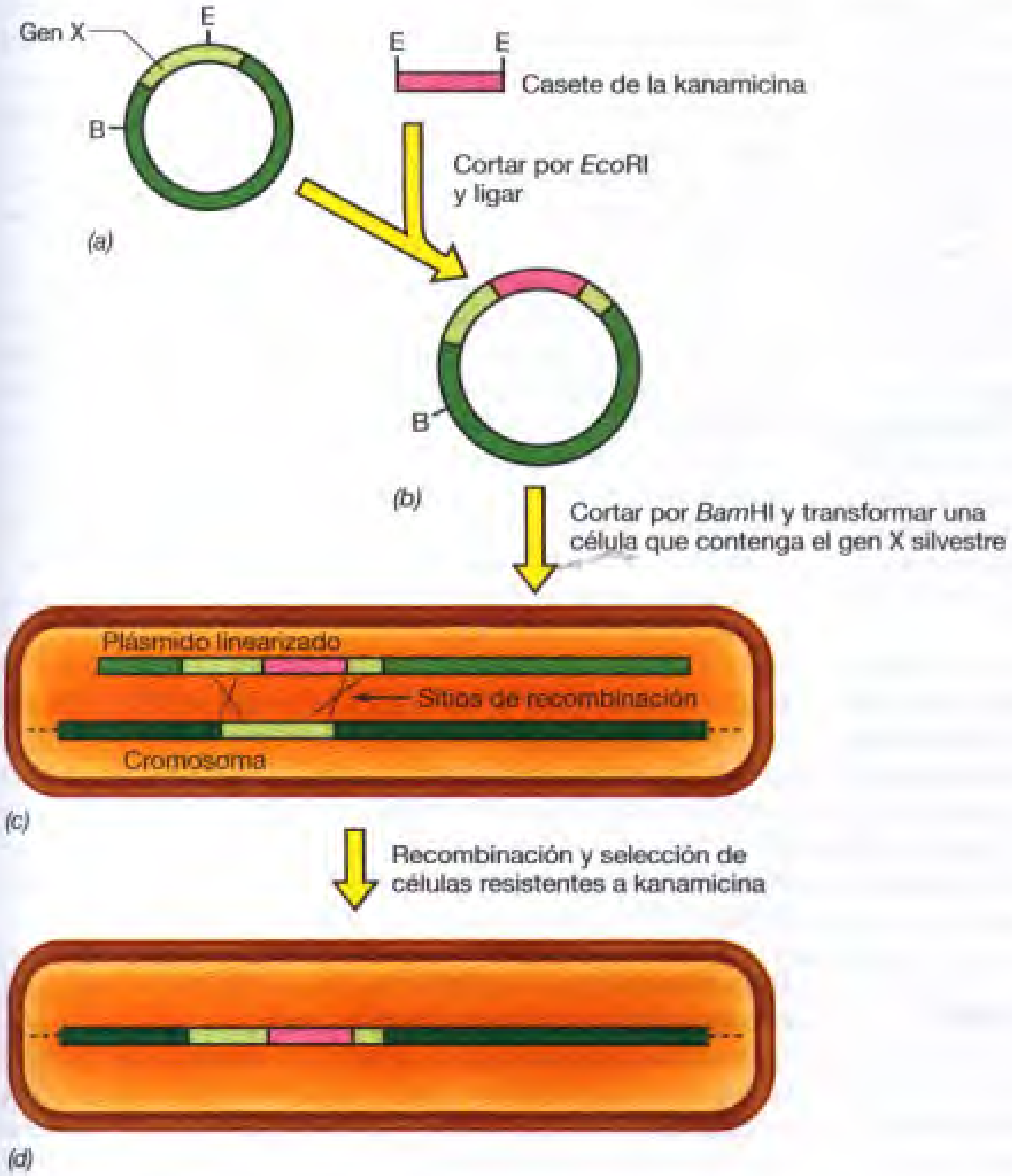

Gen X
E
B
E
E
Casete de la kanamicina
Cortar por *Eco*RI y ligar
(a)
B
(b)
Cortar por *Bam*HI y transformar una célula que contenga el gen X silvestre
Plásmido linearizado
Sitios de recombinación
Cromosoma
(c)
Recombinación y selección de células resistentes a kanamicina
(d)

Figura 10.47 Interrupción de un gen utilizando la mutagénesis por casete. (a) Un plásmido que contiene una copia clonada del gen X de tipo silvestre se corta con la enzima de restricción *Eco*RI y se mezcla con un fragmento de DNA (el casete de la kanamicina), que contiene un gen capaz de conferir a una célula resistencia a kanamicina y que había sido obtenido utilizando la misma enzima de restricción. Se ligan el plásmido cortado y el casete. (b) El producto de la ligazón es un plásmido que contiene ahora el casete de kanamicina como una mutación por inserción dentro del gen X. Este nuevo plásmido se corta ahora con una nueva enzima de restricción, *Bam*HI, y se utiliza para transformar una célula que contiene un gen X del tipo silvestre. (c)La célula transformada contiene el plásmido linearizado con un gen X interrumpido y su propio cromosoma con una copia del gen X silvestre. En algunas células ocurre recombinación homóloga entre las formas silvestre y el mutante del gen X. (d) Las células que crecen en presencia de kanamicina deben tener el casete de kanamicina recombinado en su cromosoma, ya que el plásmido linearizado no se puede replicar. Estas células tienen una única copia del gen X interrumpido. Por lo general, esta disrupción anula toda función del gen X.

tación. Nótese que la disrupción génica en organismos haploides produce células viables si el gen que se ha interrumpido no es esencial. Los experimentos de interrupción génica se usan ahora como un mecanismo para ver si un gen es esencial. Se han desarrollado métodos de interrupción génica en organismos superiores, incluidos los ratones.

✓ 10.18 Revisión de conceptos

Es posible fabricar *in vitro* moléculas de DNA sintético con la secuencia deseada y utilizarlas para construir directamente un gen mutado o para cambiar pares de bases de un gen, vía mutagénesis dirigida. Los genes también se pueden interrumpir insertando en ellos fragmentos de DNA, llamados casetes. El casete insertado elimina la función del gen silvestre y a la vez confiere a la célula un fenotipo nuevo, y generalmente seleccionable.

✓ ¿Por qué es útil la mutagénesis dirigida?

✓ ¿Qué son *mutaciones knockout*?

IV EL CROMOSOMA BACTERIANO

Los tres mecanismos de intercambio genético descritos en este capítulo, transformación, transducción y conjugación, pueden usarse para mapear las localizaciones de varios genes (en realidad, mutaciones en genes) en el cromosoma. En *Escherichia coli*, los genes fueron mapeados en una región particular del cromosoma usando la conjugación. Empleando cepas Hfr con orígenes en diferentes lugares, es posible mapear la dotación completa de los genes bacterianos.

La conjugación no permite ordenar genes que están estrechamente ligados. Por tanto, la transducción generalizada se usó para un mapeo estructural más fino del cromosoma de *E. coli*. El bacteriófago P1 puede llevar fragmentos de DNA equivalentes a aproximadamente 2 minutos en el mapa y es muy útil para el mapeo de genes. Las técnicas genéticas a utilizar vienen determinadas por la eficiencia con la que ocurre la transferencia genética en el organismo a estudiar. La transformación es un proceso poco eficaz en *E. coli*, pero lo es y mucho en otros organismos, y constituye una herramienta muy efectiva para mapear genes en *Bacillus*.

Aunque todas estas técnicas «clásicas» son aún útiles para la construcción y caracterización de cepas, en lo que concierne a la construcción de mapas genéticos han sido extensamente suplantadas por la clonación molecular (*véase* Sección 10.14), mapeo de restricción (*véase* Sección 10.12) y secuenciación de DNA (*véase* Sección 10.13), las cuales han revolucionado el estudio de la organización del genoma en procariotas (y en eucariotas).

10.19 Mapa genético del cromosoma de *Escherichia coli*

En la Figura 10.48, se muestra un mapa circular de referencia de *Escherichia coli* cepa K-12. Las distancias en el mapa se dan en minutos de transferencia, con 100 minutos para el cromosoma entero y asignando arbitrariamente el «tiempo cero» a aquel al que puede detectarse la primera transferencia genética (el operón *treonina*) usando la cepa Hfr original.

El mapa mostrado en la Figura 10.48 indica la localización de algunos sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción, y el tamaño se da tanto en minutos (las unidades originales determinadas por estudios de conjugación) como en kilopares de bases. El cromosoma de *E. coli*, como el de muchos otros procariotas, ha sido completamente secuenciado. De hecho, la secuenciación de cromosomas bacterianos relativamente «pequeños» que contienen «solamente» 3 ó 4 megabases se lleva cabo actualmente por secuenciación automática de clones aleatorios o «*shotgun*» (*véase* Sección 10.14). Dada la enorme cantidad de información genética que la secuenciación pone al descubierto, el acceso a la misma es más efectiva a través de bases de datos computerizadas (*véase* Capítulo 15).

Escherichia coli como modelo de procariota

Muchos han sido los factores que han favorecido el uso de *Escherichia coli* como el caballo de batalla para estudios de bioquímica, genética y fisiología bacteriana. Como hemos visto en los Capítulos 9 y 16, incluso los virus de *E. coli* han servido como sistemas modelo de estudio. Por tanto, aunque el cromosoma de *E. coli* no estuvo entre los primeros cromosomas eucarióticos secuenciados, este organismo permanece como el microorganismo mejor conocido. Además de su papel importante como organismo modelo, *E. coli* continúa siendo el organismo de elección tanto en investigación como en las aplicaciones de ingeniería genética (*véase* Capítulo 31).

La cepa de *E. coli* cuyo genoma se secuenció originalmente, MG1655, es un derivado de *E. coli* K-12, la cepa tradicional usada en estudios genéticos. *E. coli* K-12 «tipo silvestre» es un lisógeno del bacteriófago lambda (*véase* Sección 9.10) y también contiene el plásmido F (*véase* Sección 10.8). Sin embargo, la cepa secuenciada había sido curada de lambda (mediante radiación) y del plásmido F (mediante tratamiento con acridina, *véase* Sección 10.8). El cromosoma de esta cepa contiene 4 639 221 pares de bases. El análisis de la secuencia genómica indicó la existencia de 4288 *marcos abiertos de lectura* posibles (*véanse* Secciones 7.13 y 15.2), que rinden cuenta de aproximadamente el 88% del genoma. Aproximadamente, el 1% del genoma corresponde a genes que codifican para tRNAs y rRNAs, y aproximadamente, el 0,5% corresponde a secuencias repetitivas no codificantes (*véase* Sección 7.4). El 10% residual contiene todas las secuencias regulatorias: promotores, operadores, origen y término de la replicación y otros.

Organización y expresión de los genes del cromosoma de *Escherichia coli*

Los estudios iniciales de mapeo y los estudios de la regulación de los genes que controlan las enzimas de una única ruta biosintética habían indicado que, con frecuencia, los genes estaban agrupados. En el mapa genético de la Fi-

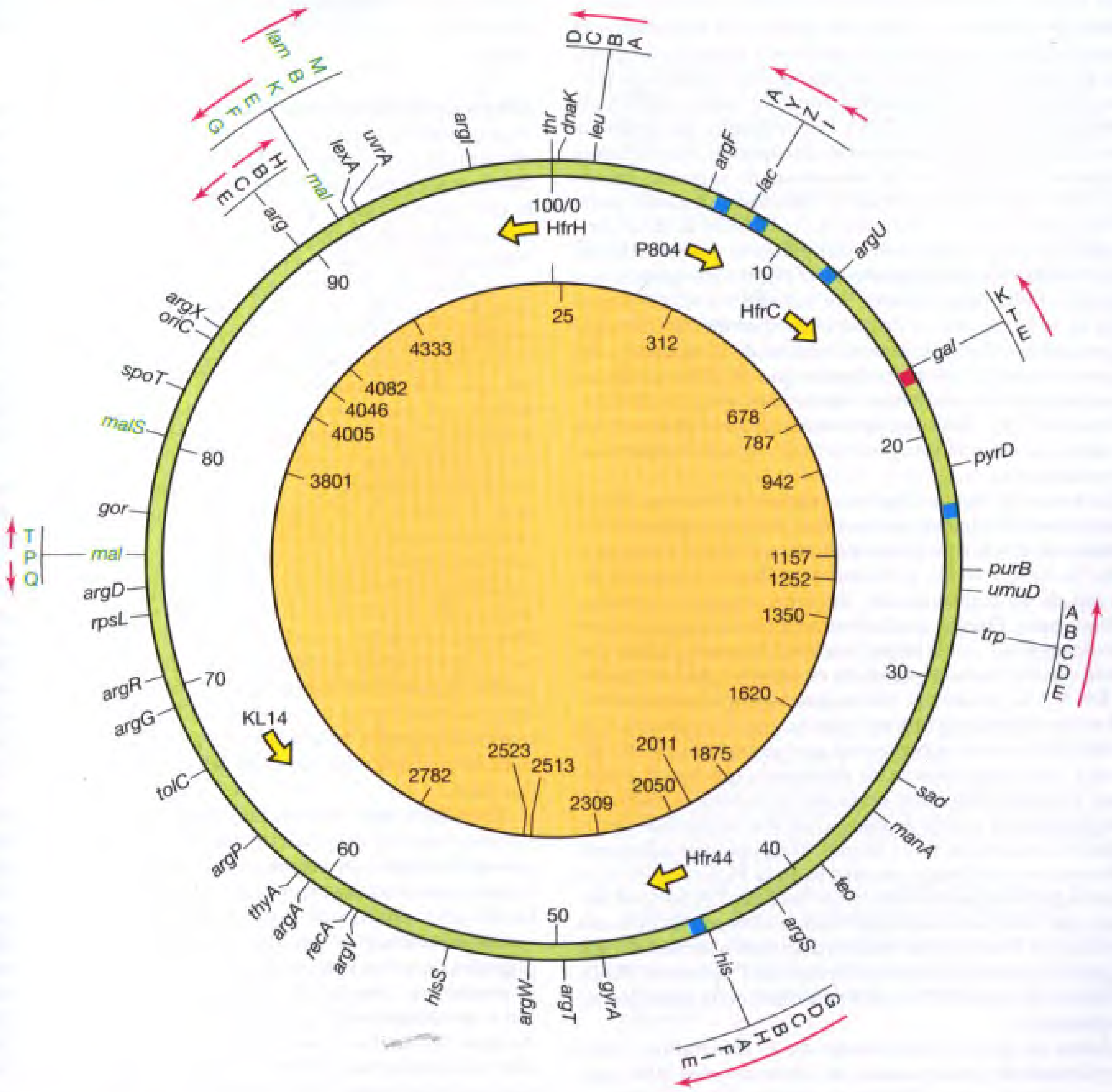

thr
dnaK
leu
D C B A
argI
uvrA
lexA
mal
lam
M B K E F G
arg
H B C E
argF
lac
A Y Z I
argU
gal
K T E
pyrD
purB
umuD
trp
A B C D E
sad
manA
leo
argS
his
G D C B H A F I E
gyrA
argT
argW
hisS
argV
recA
argA
thyA
argP
tolC
argG
argR
rpsL
argD
mal
T P Q
gor
malS
spoT
oriC
argX
100/0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
HfrH
P804
HfrC
Hfr44
KL14
25
312
678
787
942
1157
1252
1350
1620
1875
2011
2050
2309
2513
2523
2782
3801
4005
4046
4082
4333

Figura 10.48 Mapa de ligamiento circular del cromosoma de *Escherichia coli* K-12. En el borde externo del mapa, se indica la localización de algunos genes mapeados. También se muestran algunos operones, junto con la dirección en la que se transcriben. Los números de 0 a 100 en el borde interno del mapa indican la posición en minutos. El origen de la replicación del DNA está marcado como *oriC* (84,3 min) y desde este punto, la replicación procede bidireccionalmente (*véanse* Sección 7.6 y Figuras 7.16-7.20). El círculo interno del mapa muestra la localización, en kilopares de bases, de las secuencias reconocidas por la enzima de restricción *NotI*. Obsérvese que, por convención, el minuto 0 y la kilobase 0 coinciden con el locus *thr*. Los orígenes y direcciones de transferencia de varias cepas Hfr están también indicados (flechas). En azul, se muestran las posiciones en las que se han localizado cinco copias del elemento transponible IS*3* en una cepa particular. Este elemento también se encuentra en dos copias del plásmido F y está implicado en la formación de Hfr (*véase* Sección 10.9). La posición del sitio donde se integre el bacteriófago lambda se muestra en rojo (*véase* Sección 9.10). Si el profago estuviera presente añadiría 48,5 kilopares de bases (algo más de un minuto) al mapa. Los genes del regulón de la maltosa (*véase* Sección 8.6), que incluye varios operones, se muestran en verde. Aunque la mayoría de los genes en este regulón tienen una abreviatura que comienza por *mal*, adviértase que uno de los genes es *lamB*. Este gen codifica una proteína de membrana responsable del transporte de maltosa por la célula, pero la proteína actúa también como receptor del bacteriófago lambda. El gen *rpsL* (73 min) codifica una proteína ribosomal. Este gen se llamaba antes *str*, ya que mutaciones en él originan resistencia a estreptomicina.

gura 10.48 se muestran algunos de estos agrupamientos. Nótese, por ejemplo, el grupo de genes *gal* a 18 minutos, el grupo de genes *trp* a unos 28 minutos, y el grupo de genes *his* a 44 minutos. Cada uno de estos agrupamientos es parte de un operón y se transcribe como un único mRNA *policistrónico* (*véase* Sección 7.11). Sin embargo, los genes de otras rutas bioquímicas no están agrupados, por ejemplo, los genes implicados en la biosíntesis de arginina (genes *arg*) están esparcidos por todo el cromosoma, como parte del regulón *arg* (*véase* Sección 8.5). Debido al descubrimiento inicial de operones multigénicos, y a su utilidad como modelos para el estudio de la regulación génica, por ejemplo, el operón *lac* (*véanse* Secciones 8.5 y 8.7), a menudo se tiene la impresión de que tales operones son la regla en procariotas. Sin embargo, el análisis de la secuencia del cromosoma de *E. coli* ha indicado que de 2584 unidades transcripcionales predichas o conocidas, más del 70% tienen un *solo* gen. Tan sólo, aproximadamente el 6% de los operones tienen mRNAs policistrónico que codifican cuatro o más genes.

La transcripción de algunos operones transcurre en una dirección a lo largo del cromosoma, mientras que en otros operones la transcripción transcurre en la dirección opuesta. En la Figura 10.48, se muestra mediante flechas la dirección de la transcripción de unos cuantos operones multigénicos. Puesto que la transcripción siempre ocurre en la dirección 5′ → 3′ (*véase* Sección 7.8), esto implica que puede ocurrir transcripción de cualquiera de las bandas del DNA, y la evidencia indica que hay aproximadamente el mismo tipo de operones en cada una de las bandas. Ya era conocido que muchos genes que se expresan a alto nivel en *E. coli* están orientados de manera que son transcritos en la misma dirección en la que se mueve la horquilla de replicación a través de ellos. [Las dos horquillas de replicación comienzan en el origen, *oriC*, aproximadamente a 84 minutos en el mapa mostrado en la Figura 10.48, y se mueven bidireccionalmente (*véase* Sección 7.6) hacia el término, que está localizado a aproximadamente 34 minutos en el mapa.] Esto ha sido confirmado por la secuenciación del genoma, que ha demostrado que los 7 operones rRNA y 53 de los 86 genes tRNA, se transcriben en la dirección de la replicación.

Antes de que el cromosoma de *E. coli* hubiese sido completamente secuenciado, se conocían casi 2000 proteínas, o genes que codifican proteínas. Ahora sabemos que, teóricamente, el organismo puede codificar un total de 4.288 proteínas, aunque aproximadamente el 38% de ellas son de función desconocida y/o son hipotéticas. Como era de esperar, la proteína «media» de *E. coli* contiene algo más de 300 aminoácidos, pero muchas proteínas son más pequeñas y otras mucho más grandes. El gen más grande debe codificar una proteína de 2.383 aminoácidos cuya función se desconoce, pero el gen es similar a otros implicados en patogénesis en organismos relacionados. Aunque *E. coli* tiene muy pocos genes duplicados, muchos de los genes que codifican proteínas parecen haber surgido claramente por duplicación génica a lo largo de la historia evolutiva. Existen algunas *familias génicas* amplias, grupos de genes que poseen secuencias relacionadas y con productos que tienen también funciones relacionadas. Por ejemplo, hay una familia de 70 genes cuyos productos son proteínas transportadoras de membrana.

Otras características del cromosoma de *E. coli*

Aún cuando la cepa de *E. coli* secuenciada se había curado de lambda y del plásmido F, el cromosoma contenía muchos otros elementos genéticos que se replican como parte del mismo. Hay copias de 10 elementos IS diferentes, incluyendo siete copias de IS2 y cinco copias de IS3 (*véase* Sección 10.11). Ambos elementos se encuentran también en el plásmido F y ambos están implicados en la formación de cepas Hfr (*véanse* Sección 10.9 y Figura 10.22). Hay también varios profagos defectivos crípticos diferentes (tres de los cuales están relacionados con lambda) y varios genes que son claramente partes de otros profagos, actualmente casi completamente perdidos mediante deleción. Además, *E. coli* ha obtenido probablemente una porción de su genoma por *transferencia génica horizontal*; esto es, genes que se originaron en otros organismos. Se ha estimado que al menos el 18% del genoma de *E. coli* K-12 se ha originado de tales transferencias. Aún pueden producirse cambios a gran escala en el genoma a través de tales mecanismos. Se conocen cepas de *E. coli* que contienen genes implicados en virulencia, localizados en grandes e inestables regiones del cromosoma llamadas *islas de patogenicidad*, las cuales pueden ser adquiridas por transferencia horizontal. Resulta interesante que la transferencia horizontal de genes no implica necesariamente un incremento del tamaño del genoma. Muchos de los genes adquiridos de esta manera no confieren ventajas selectivas y se pierden por deleción.

El análisis de la secuencia completa del genoma puede suministrar gran cantidad de información: aparentemente, tan sólo limitada por las preguntas que el investigador desee formular (*véase* Capítulo 15). Puesto que la genética molecular de *E. coli* ha sido explorada seriamente a lo largo de varias décadas, y su genoma ha sido ahora secuenciado, ¿significa que los nuevos análisis se realizarán mayoritariamente por computadora y que los estudios bioquímicos y genéticos de *E. coli* están superados? ¡En absoluto! Aunque los análisis computarizados de la secuencia pueden suministrar mucha información, la comprensión de la *función* de los genes, y en particular la de las secuencias reguladoras, requiere a menudo aislar mutantes, mapear sus mutaciones y disponer de análisis bioquímicos y fisiológicos para determinar sus efectos en el organismo.

✓ 10.19 Revisión de conceptos

El cromosoma de *Escherichia coli* se ha mapeado usando conjugación, transducción, clonación molecular y secuenciación. *E. coli* ha sido un organismo modelo muy útil, y de él se ha obtenido gran cantidad de información, no sólo de la estructura del gen sino también de su función y regulación.

✓ Por lo geneneral, los mapas genéticos de los cromosomas procarióticos se confeccionan ahora usando sólo la clonación molecular y la secuenciación del DNA. ¿Por qué se utilizaron también otros métodos en el caso de *E. coli*?

Preguntas de repaso

1. Escriba una definición del término *genotipo* en una sola frase. Haga lo mismo para el término *fenotipo*. Cuando se produce un cambio en el genotipo de un organismo, ¿cambia automáticamente el fenotipo? ¿Por qué? ¿Puede cambiar el fenotipo sin cambios en el genotipo? Suministre ejemplos para ilustrar sus respuestas.
2. Explique por qué una cepa de *Escherichia coli* que es His$^-$ es auxotrofa y una Lac$^-$ no lo es. (*Sugerencia:* piense lo que *E. coli* hace con la histidina y con la lactosa.)
3. ¿Qué son las mutaciones silenciosas y por qué se producen? Considerando sus conocimientos sobre código genético, ¿por qué piensa que la mayoría de las mutaciones silenciosas ocurren en la *tercera* posición del codón?
4. En los promotores ocurren inserciones que no son mutaciones de cambio de fase en la lectura. Defina los términos cambio de fase por *microinserción*, *mutación* y *promotor* (*véase* Sección 7.9). Explique por qué la afirmación anterior puede ser verdad.
5. Explique cómo es posible que una mutación por cambio en la fase de lectura al comienzo de un gen puede corregirse por otra mutación de cambio de fase más adelante en el mismo gen.
6. Ponga un ejemplo de un mutágeno biológico, uno químico y uno físico, y describa el mecanismo por el cual cada uno causa la mutación.
7. ¿Qué es la mutagénesis específica de sitio o mutación dirigida? ¿Cómo es posible por este método marcar genes específicos para mutagénesis?
8. ¿En qué se diferencian la recombinación homóloga de la recombinación específica de sitio?
9. ¿Por qué resulta difícil transferir a una célula mediante transformación un gran número de genes en un único experimento?
10. Explique la razón por la cual en la transducción generalizada uno se refiere a la *partícula* transductora mientras que en la transducción especializada se emplea el término *virus* transductor (o fago transductor).
11. Algunos plásmidos conjugativos de *Bacteria* Gram negativas tienen genes implicados en conjugación ordenados en dos regiones, en lugar de una. Una región se llama *Dtr* y la otra *Mpf*. ¿A qué se refieren estos acrónimos?
13. Explicar por qué la inserción de un transposón origina una mutación.
14. Los transposones más útiles para aislar mutantes bacterianos son transposones que contienen genes de resistencia a antibióticos. ¿Por qué resultan tan útiles para este fin dichos transposones?
15. ¿Qué son las enzimas de restricción? ¿Cuál es la función probable de una enzima de restricción en la célula que la produce? ¿A qué se debe que la enzima de restricción en una célula no cause daño al DNA de la propia célula?
16. ¿Cuáles son las características principales de un vector de clonación? ¿Cuáles son las características de los plásmidos que los hacen tan útiles en la clonación? ¿Qué característica(s) del plásmido F lo hacen menos útil para ser usado *in vitro*?
17. Si se utiliza la inactivación por inserción de un gen de resistencia a un antibiótico para detectar la presencia de un plásmido que contenga DNA foráneo, ¿por qué es deseable tener en el plásmido dos marcadores de resistencia a antibióticos?
18. ¿Qué ventajas puede tener la utilización de un vector viral en lugar de un vector plasmídico?
19. Describa los principios básicos de la amplificación génica usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ¿Cómo han simplificado las bacterias termófilas el uso de la PCR?
20. ¿Cuáles son las similitudes y diferencias entre la *mutagénesis por casete* y la *mutagénesis por transposón*?
21. Diferenciar claramente entre las palabras *genoma* y *cromosoma* en lo que se refiere a su uso en un procariota. ¿En qué casos tendrían las dos palabras el mismo significado?

Ejercicios prácticos

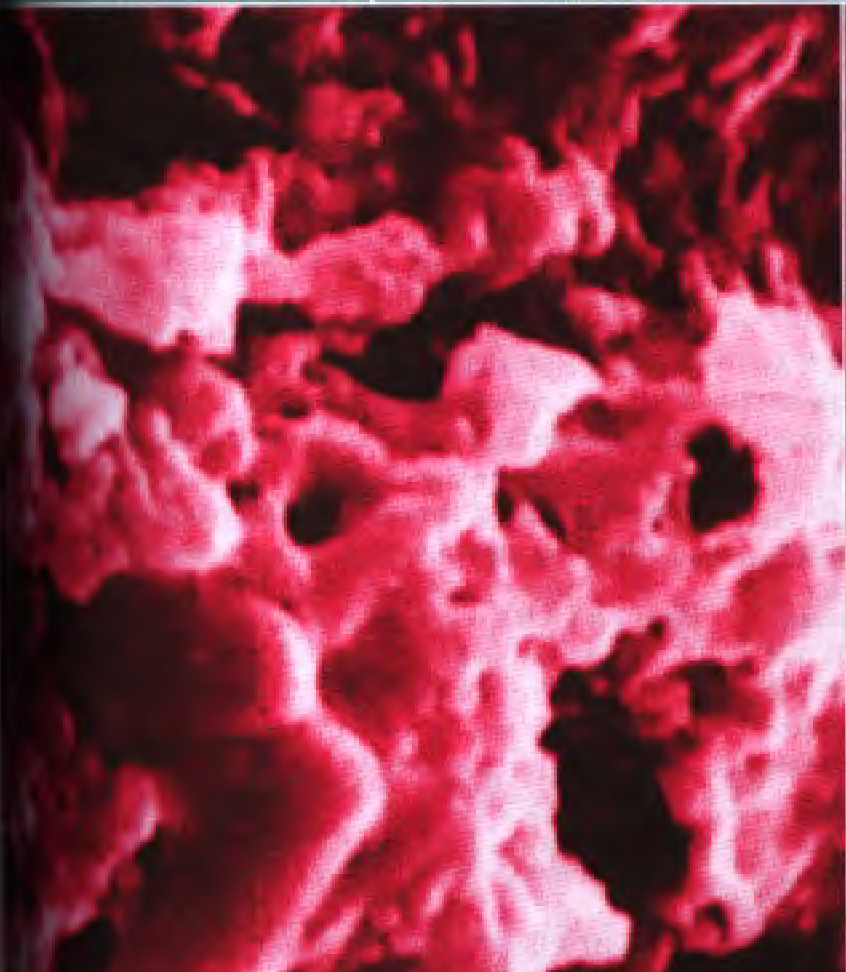
1. Las mutaciones en un gen que codifica una proteína pueden suprimirse, a veces, por una mutación en otro gen. Un tipo de *mutación supresora* implica un cambio en tRNA. Dibuje un diagrama con secuencias codificantes y secuencias de aminoácidos indicando cómo ocurre esto.
2. Un mutante constitutivo es una cepa que produce continuamente una proteína que es inducible en el tipo silvestre. Describa dos modos por los que un cambio en una molécula de DNA podía conducir a la aparición de un mutante constitutivo. ¿Cómo se podrían distinguir genéticamente estos dos tipos de mutantes constitutivos?
3. En el Capítulo 7, vimos que para el ribosoma era importante realizar la translocación con gran precisión a fin de mantener la fase de lectura apropiada. Sin embargo, algunas veces los ribosomas cometen algunos errores de lectura. Compare las consecuencias en la célula de un ribosoma que cometa periódicamente un error de lectura de un mRNA de un gen particular con las de una mutación en la lectura del mismo gen.

4. Aunque se conoce un gran número de mutágenos químicos, no se conoce ningún compuesto químico capaz de inducir mutación en un solo gen (mutagénesis específica para un gen). Por lo que conoce acerca de los mutágenos, explique por qué es improbable que se encuentre un mutágeno químico específico de un gen. ¿Cómo se lleva a cabo entonces la mutagénesis dirigida?
5. Los fagos defectivos que aparecen en la transducción especializada pueden replicarse en una célula en la que se está replicando un fago auxiliar. Sin embargo, en la transducción generalizada la partícula transductora no puede replicarse aunque la célula se infecte con un fago del tipo silvestre. Explique cómo un fago auxiliar «ayuda» al fago transductante y por qué esto no es posible para la partícula transductante generalizada.
6. Los elementos transponibles causan mutaciones cuando se insertan dentro de un gen. Estos elementos interrumpen la continuidad del gen. Podría pensarse que los intrones (*véase* Sección 7.12) interrumpen la continuidad del gen y el gen es aún funcional. Explique por qué la presencia de un intrón en un gen no inactiva el gen, mientras que la inserción de un elemento transponible sí lo hace.
7. Las secuencias de inserción se transponen (un tipo de recombinación específica de sitio) en las células que tienen el gen *recA* defectivo. Sin embargo, en una célula con el gen *recA* defectivo no se produce la formación de una cepa Hfr a partir de una cepa F^+, aunque éste sea un acontecimiento que requiera secuencias de inserción y recombinación. Explique cómo tiene lugar la formación de Hfr y por qué la proteína RecA es esencial.
8. Los ácidos nucleicos pueden separarse en gel sobre la base de su forma y tamaño. No se diferencian estrictamente por carga, debido a que esencialmente todos los fragmentos de DNA tienen la misma razón entre carga y masa. Explique por qué.
9. Cuando se emplea el vector plasmídico pUC18, los fragmentos de DNA obtenidos al utilizar la enzima de restricción *Bam*HI inactivan el gen que codifica la β-galactosidasa. Cuando se utiliza pBR322, la clonación de los mismos fragmentos inactiva el gen que confiere resistencia a la tetraciclina. Ambos vectores contienen un gen que confiere resistencia a ampicilina, que se utiliza para seleccionar los transformantes bacterianos después de hacer las moléculas recombinantes. Explique por qué es más eficiente el uso de pUC18 que el de pBR322 como vector de clonación. (*Sugerencia:* la mayor eficiencia también tiene que ver con la identificación de células que contengan vectores con DNA clonado.)

Aunque sabemos que los procariotas son antiguos, tal y como ponen de manifiesto los microfósiles celulares encontrados en rocas de 3500 millones de años de antigüedad, hasta hace unos 20 años los microbiólogos no dispusieron de herramientas útiles que les permitiesen determinar sus relaciones evolutivas. Esto puede hacerse ahora de una manera casi rutinaria mediante métodos moleculares tales como la secuenciación de ácidos nucleicos y posterior comparación de secuencias. La historia evolutiva de los procariotas refleja la historia evolutiva de la propia Tierra y tal como se ha hecho durante años con los organismos pluricelulares, los microorganismos, y en particular los procariotas, pueden ser ahora ubicados con bastante fiabilidad en el árbol filogenético de la vida.

11

EVOLUCIÓN MICROBIANA Y SISTEMÁTICA



I LA TIERRA PRIMITIVA, EL ORIGEN DE LA VIDA Y LA DIVERSIFICACIÓN BIOLÓGICA 322
11.1 Evolución de la Tierra y formas primitivas de vida 322
11.2 La vida primitiva: el mundo con RNA, códigos moleculares y producción de energía 325
11.3 Orgánulos y eucariotas: endosimbiosis 328

II RELACIONES EVOLUTIVAS ENTRE LOS MICROORGANISMOS 330
11.4 Cronómetros evolutivos 330
11.5 Secuencias del RNA ribosómico y evolución celular 332
11.6 Secuencias signatura, sondas filogenéticas y análisis de la comunidad microbiana 333
11.7 Filogenia microbiana derivada de secuencias del RNA ribosómico 335
11.8 Características de los dominios de la vida 338

III TAXONOMÍA MICROBIANA Y SU RELACIÓN CON LA FILOGENIA 341
11.9 Taxonomía clásica 341
11.10 Taxonomía molecular 342
11.11 El concepto de especie en microbiología 345
11.12 Nomenclatura y el *Manual de Bergey* 348

Glosario

Árbol universal un árbol filogenético que muestra la posición de los representantes de todos los dominios de organismos vivos

Archaea un grupo de procariotas relacionados filogenéticamente y distinto de *Bacteria*

Bacteria un grupo de procariotas filogenéticamente relacionados y distinto de *Archaea*

Cronómetro evolutivo una molécula, tal como el RNA ribosómico, cuya secuencia molecular puede utilizarse para medir divergencias evolutivas

Distancia evolutiva en el árbol filogenético, la suma de las distancias físicas que separan dos organismos de su antecesor común en un árbol; esta distancia es inversamente proporcional a su relación evolutiva

Dominio en sentido taxonómico, el nivel más alto de clasificación biológica

Ecotipo una población de células genéticamente idénticas que comparten un medio (recurso) particular dentro de un nicho ecológico

Endosimbiosis una teoría que propone que la mitocondria y el cloroplasto fueron inicialmente *Bacteria* de vida libre que establecieron una residencia permanente en las células eucarióticas primitivas, dando origen finalmente a la célula eucariótica moderna

Especie en microbiología, una colección de cepas que comparten un gran número de propiedades importantes pero difieren en una o más propiedades significativas de otras colecciones de cepas

Estromatolitos masas microbianas laminadas, típicamente construidas por capas de organismos filamentosos y no filamentosos que pueden encontrarse fosilizadas

Eukarya todas las células eucarióticas: algas, protozoos hongos, hongos mucosos, plantas y animales

FAME metil éster de ácido graso

Familia en la clasificación biológica, un nivel intermedio de jerarquía taxonómica. Contiene uno o más géneros, cada uno con una o más especies

Filogenia historia evolutiva de los organismos

FISH hibridación fluorescente *in situ*

Género una colección de especies diferentes, que comparten una o más propiedades (generalmente varias propiedades)

Hibridación genómica la determinación experimental de las similitudes entre dos genomas mediante la cuantificación del grado de hibridación de los DNA genómicos de dos organismos

Metazoos organismos pluricelulares

Orgánulo estructuras del tamaño de bacterias, rodeadas de una unidad de membrana y especializadas en funciones metabólicas que se encuentran dentro de las células eucarióticas

Phylum principal linaje de células en uno de los tres dominios de vida

Porcentaje de bases GC en el DNA (o RNA) de cualquier organismo, el porcentaje del DNA constituido por guanina y citosina

Proteobacteria un grupo grande de *Bacteria* Gram negativas relacionadas filogenéticamente

Proyecto de Base de Datos del Ribosoma (RDP) una gran base de datos a la que puede accederse electrónicamente y que contiene secuencias del RNA de la subunidad pequeña del ribosoma y se utilizan en estudios de comparación de secuencias del RNA ribosómico

Ribotipado una técnica para identificar microorganismos a partir del análisis de los fragmentos de DNA generados por digestión de los genes que codifican su rRNA 16S con enzimas de restricción

rRNA 16S un polinucleótido grande (~1500 bases) que funciona como parte de la subunidad pequeña del ribosoma de procariotas y de cuya secuencia puede obtenerse información evolutiva; el correlativo eucariótico es el rRNA 18S

Secuencia signatura oligonucleótido corto de secuencia definida presente en el rRNA 16S o 18S característico de un organismo específico o grupo de organismos relacionados filogenéticamente y útil para la construcción de sondas

Sistema binomial el sistema propuesto por Linneo para denominar a un organismo vivo según el cual a cada organismo se le da un nombre genérico y un epíteto de especie

Sonda filogenética un oligonucleótido, algunas veces convertido en fluorescente por la unión de un colorante, con una secuencia complementaria a alguna secuencia signatura del RNA ribosómico

Taxonomía la ciencia de la identificación, clasificación y nomenclatura

Transferencia lateral (horizontal) de genes el intercambio de genes entre todas las células de una comunidad microbiana

Vida con RNA una forma de vida carente de DNA y proteína que pudo haber existido en la Tierra primitiva y en la que el RNA servía a la vez de material genético y catalítico

I LA TIERRA PRIMITIVA, EL ORIGEN DE LA VIDA Y LA DIVERSIFICACIÓN BIOLÓGICA

Un tema integrador de toda la biología es la enorme diversidad de organismos vivos en la Tierra. Esto es especialmente cierto para los microorganismos. En este capítulo viajaremos a un tiempo anterior, al momento en que las células evolucionaron hasta la célula eucariótica moderna. Aprenderemos que la química prebiótica pudo haber suministrado los requisitos necesarios para la vida, que la vida primitiva pudo no haber sido celular, que las fuentes de energía primitivas pudieron haber sido inorgánicas y que la célula eucariótica es una quimera genética formada por al menos dos organismos.

11.1 Evolución de la Tierra y formas primitivas de vida

Origen de la Tierra

La Tierra tiene una edad de unos 4600 millones de años según las determinaciones geoquímicas. Nuestro sistema solar se formó cuando una estrella enorme y muy caliente explotó, originando una nueva estrella (el Sol) y los otros componentes de nuestra galaxia. Aunque no se han descubierto rocas de ese período en la Tierra, presumiblemente porque han sido transformadas por el tiempo, se han descubierto rocas de casi *4000 millones* de años en varios lugares del planeta.

Las rocas más antiguas descubiertas hasta ahora son los gneis del complejo Itsaq en el Suroeste de Groenlandia [*N. de la R.*: gneis, roca metamórfica de grano grueso, caracterizada por presentar cadenas constituidas alternativamente por minerales claros (cuarzo y feldespato) y oscuros (mica y hornblenda)] que datan de hace 3860 millones de años. Estas rocas son de tres tipos: sedimentarias, volcánicas y carbonatos. Las rocas sedimentarias tienen un interés evolutivo particular porque, de acuerdo con nuestros conceptos de cómo se forman las rocas sedimentarias modernas, la presencia de rocas sedimentarias hace 3860 millones de años sugiere que en aquel tiempo ya existía *agua líquida* en forma de océanos o grandes lagos. La presencia de agua líquida implica a su vez que las condiciones de la Tierra eran entonces compatibles probablemente con la vida tal como la conocemos actualmente. Otras rocas de origen muy antiguo son la serie de Warrawoona, la Formación de las Torres y el supergrupo Pibara en el Oeste de Australia y el supergrupo Swaziland en Sudáfrica; todas estas formaciones tienen una edad de unos 3500 millones de años (Figura 11.1).

Evidencia de vida microbiana en la Tierra primitiva

La evidencia de vida microbiana en las rocas más antiguas conocidas es escasa y reside en los restos fosilizados de material carbonatado y en la abundancia del isótopo «ligero» del carbono en estas rocas (comentaremos la utilidad del análisis de isótopos del carbono y el azufre como una indicación de procesos vivos en la Sección 18.11). Algunas rocas antiguas contienen microfósiles que poseen forma de bacterias, generalmente tan simples como cocos o bacilos (Figura 11.1). Con esa misma edad (~3500 millones de años) también existen formaciones microbianas denominadas *estromatolitos*. Los **estromatolitos** son estructuras fosilizadas de masas microbianas formadas por capas de procariotas filamentosos y sedimentos atrapados en ellas (Figura 11.2*a* y *b*); explicaremos algunas características de las masas microbianas en la Sección 18.11. ¿Qué tipo de microorganismos eran estas antiguas bacterias estromatolíticas? Comparando estromatolitos antiguos con los estromatolitos modernos que crecen en plataformas marinas poco profundas (Figura 11.2*c-e*) o en fuentes termales (Figura 11.2*f*; *véase* Figura 18.18*a*), los científicos han concluido que estaban formados por bacterias filamentosas fototróficas, quizá emparentadas con la bacteria verde no del azufre *Chloroflexus* (*véase* Sección 12.36).

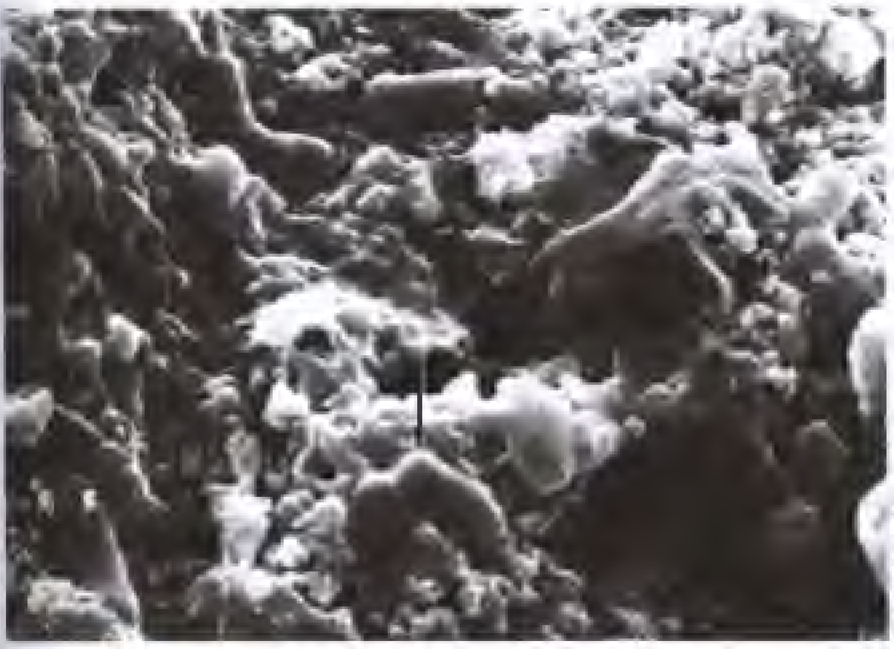

Frances Westall

Figura 11.1 Micrografía electrónica de barrido de microfósiles de procariotas presentes en rocas de 3500 millones de años de antigüedad del Barbeton Greenstone Belt, Sudáfrica. Nótese las bacterias de forma bacilar (flecha) unidas a partículas de materia mineral. Las células tienen unos 0,7μm de diámetro.

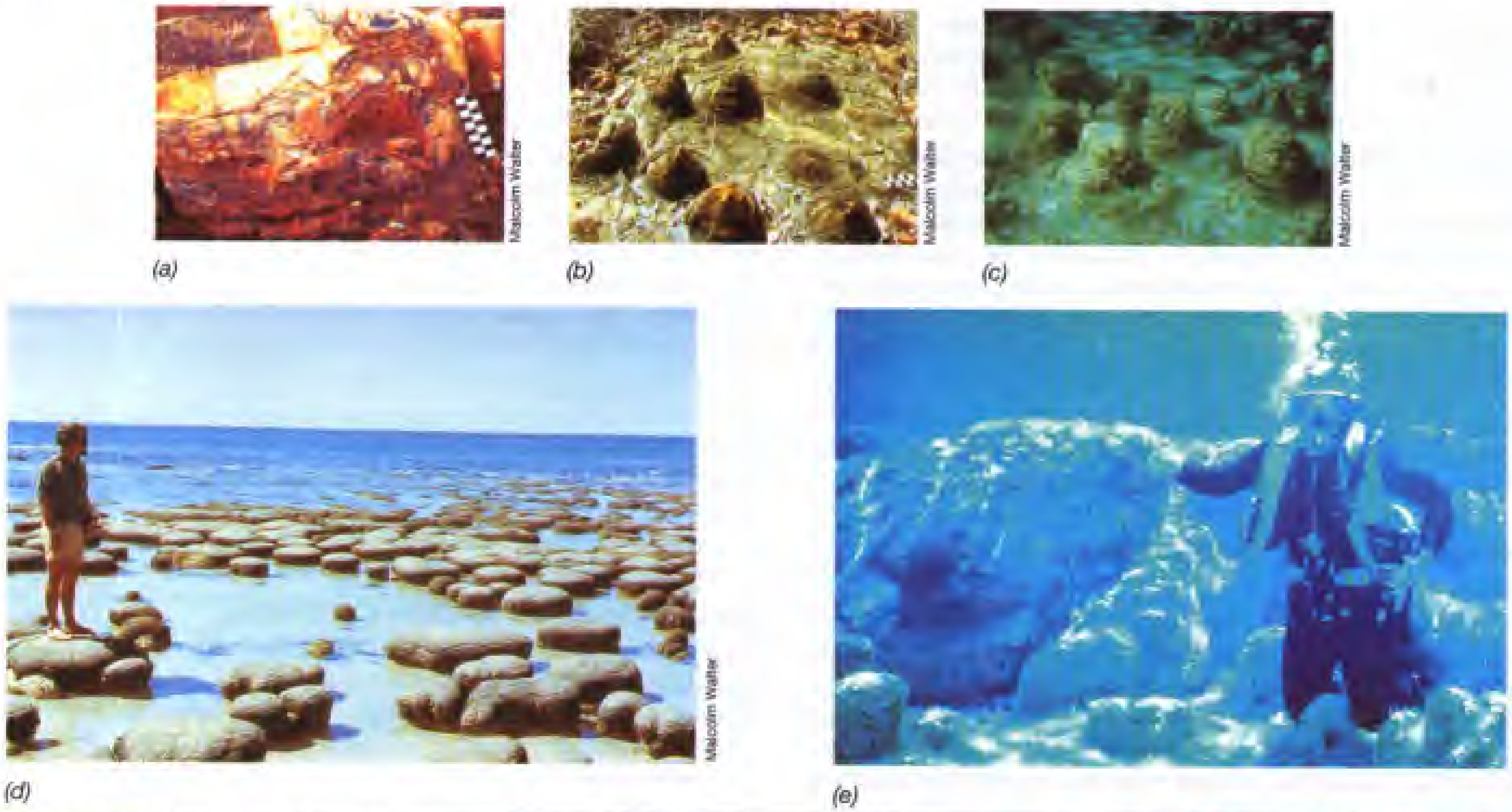
La Figura 11.3 muestra micrografías de cortes finos de rocas más recientes que poseen estructuras que recuerdan a células del tipo de las bacterias filamentosas modernas y las algas verdes (*véase* Sección 14.12). En los estromatolitos más antiguos, estos organismos eran posiblemente bacterias fototrofas anoxigénicas (no generadoras de oxígeno) (*véanse* Secciones 12.2, 12.21,12.33 y 12.36) en lugar de las cianobacterias productoras de O_2 (*véanse* Secciones 12.26 y 12.27) que predominan en los estromatolitos modernos. No obstante, la conclusión ineludible es que los microorganismos *procarióticos* habían alcanzado una diversidad morfológica impresionante en etapas muy tempranas de la historia de la vida en la Tierra.

Condiciones de la Tierra primitiva

La atmósfera de la Tierra primitiva carecía de cantidades significativas de O_2 y, por tanto, constituía un ambiente reductor. Además de H_2O, estaban presentes una variedad de gases, siendo los más abundantes el metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2), nitrógeno (N_2) y amoníaco (NH_3). Además, existían trazas de monóxido de carbono (CO) e hidrógeno (H_2), así como cantidades considerables de H_2S y FeS. Es también probable que en la Tierra primitiva se produjera una cantidad considerable de cianuro de hidrógeno, HCN, a partir de la reacción del NH_3 y el CH_4. Las estimaciones geoquímicas de la temperatura de la superficie también sugieren que la Tierra primitiva era un planeta mucho más caliente que en la actualidad. Durante los primeros 500 millones de años de su existencia es probable que la temperatura de la superficie de la Tierra excediera los 100ºC y fuera bombardeada por meteoritos. Así, en la Tierra primitiva no existiría agua líquida pero se acumularía más tarde al enfriarse el planeta. No se conoce la rapidez con que se enfrió la Tierra pero se ha sugerido que las primeras entidades autorreplicativas aparecieron cuando la Tierra era mucho más caliente que en la actualidad. Así, las formas primitivas de vida eran probablemente tolerantes al calor y, a este respecto, podrían haberse asemejado a los procariotas termofílicos actuales que habitan los ambientes termales (*véanse* Sección 6.10 y Capítulo 13). En la Sección 11.8 consideraremos la evidencia evolutiva que apoya esta hipótesis.

El origen de la vida

En la actualidad, está bien establecido que la síntesis de las moléculas biológicamente importantes puede producirse si una atmósfera reductora que contenga los gases anteriormente mencionados, se somete a una intensa fuente de energía. De las fuentes de energía que impactaban sobre la Tierra primitiva, la más importante era la radiación ultravioleta (UV) del sol, pero los relámpagos, la radiactividad, el calor de los impactos de los meteoritos y la energía térmica de la actividad volcánica eran también significativos. Si las mezclas de gases que se cree que estaban presentes en la Tierra primitiva se irradian con UV o se someten a descargas eléctricas en el laboratorio, se pueden generar una amplia variedad de moléculas bioquímicamente impor-



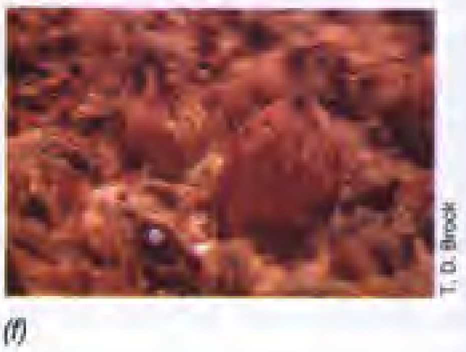


Figura 11.2 Estromatolitos antiguos y modernos. (a) El estromatolito más antiguo conocido, encontrado en una roca de 3500 millones de años de antigüedad del Grupo Warrawona en el Oeste de Australia. Se muestra una sección vertical de una estructura laminada semiesférica conservada en la roca. Escala: 10 cm. (b) Estromatolitos de forma cónica de una roca dolomítica de 1600 millones de años de antigüedad de la plataforma McArthur en el Territorio Norte de Australia. (c) Estromatolitos modernos en una bahía marina de aguas templadas, Shark Bay, en el Oeste de Australia. (d) Otra vista de grandes estromatolitos modernos que se forman en la bahía del Tiburón (Shark Bay). Nótese el parecido con los estromatolitos mostrados en (b). (e) Fotografía submarina de estromatolitos modernos en formación de la Bahía Shark. El buzo sirve de escala. Se muestran grandes columnas formadas por una compleja comunidad de diatomeas, cianobacterias y algas verdes, a las que se unen varias algas microscópicas. (f) Estromatolitos modernos compuestos de cianobacterias termófilas en una fuente termal en el Parque Nacional de Yellowstone. Cada estructura tiene aproximadamente 2 cm de altura.

tantes, tales como azúcares, aminoácidos, purinas, pirimidinas, varios nucleótidos, tioésteres y ácidos grasos. Moléculas bioquímicas críticas, tal como el piruvato, se han producido también a altas presiones y temperaturas características de las fuentes hidrotermales submarinas (*véase* Sección, 19.8); por ésta y otras razones, muchos científicos creen que tales fuentes hidrotermales pudieron haber engendrado las primeras formas de vida.

Se ha demostrado que, bajo condiciones prebiológicas, algunos de estos bloques bioquímicos pueden *polimerizar* dando lugar a la formación de polipéptidos, polinucleótidos y otras moléculas importantes. Por tanto, podemos imaginar que, de alguna manera, sobre la Tierra primitiva finalmente se acumularon una mezcla de compuestos orgánicos, proporcionando las condiciones que permitirían la aparición de la vida.

Pero, ¿cómo pudieron originarse las *macromoléculas* espontáneamente a partir de los constituyentes monoméricos? Una posibilidad aprobada en la actualidad es que las *superficies expuestas* relativamente anhidras de compuestos tales como las arcillas, piritas o vidrios basálticos funcionaran como soportes en las reacciones de polimerización prebiótica. Tales superficies habrían proporcionado un ambiente estable y relativamente seco para la síntesis y acumulación de macromoléculas en películas orgánicas de las que podrían haber emergido estructuras autorreplicativas primitivas. Entre las sustancias clave para estos procesos se han sugerido la pirita (Fe$_2$S) y la arcilla Montmorillonita, debido a la función crucial que la primera podría haber tenido en los sistemas generadores de energía primitivos (*véase* sección siguiente) y la conocida capacidad de la segunda para absorber selectivamente monómeros de ácido ribonucleico y formar a partir de ellos oligómeros de RNA.

✓ *11.1 Revisión de conceptos*

Se cree que la Tierra tiene una edad de 4600 millones de años; la primera evidencia de vida microbiana se observa en rocas de 3860 millones de años. La Tierra primitiva era anóxica y mucho más caliente que en la actualidad. Los primeros compuestos bioquímicos se formaron por síntesis abiótica y esto estableció las bases para el origen de la vida.

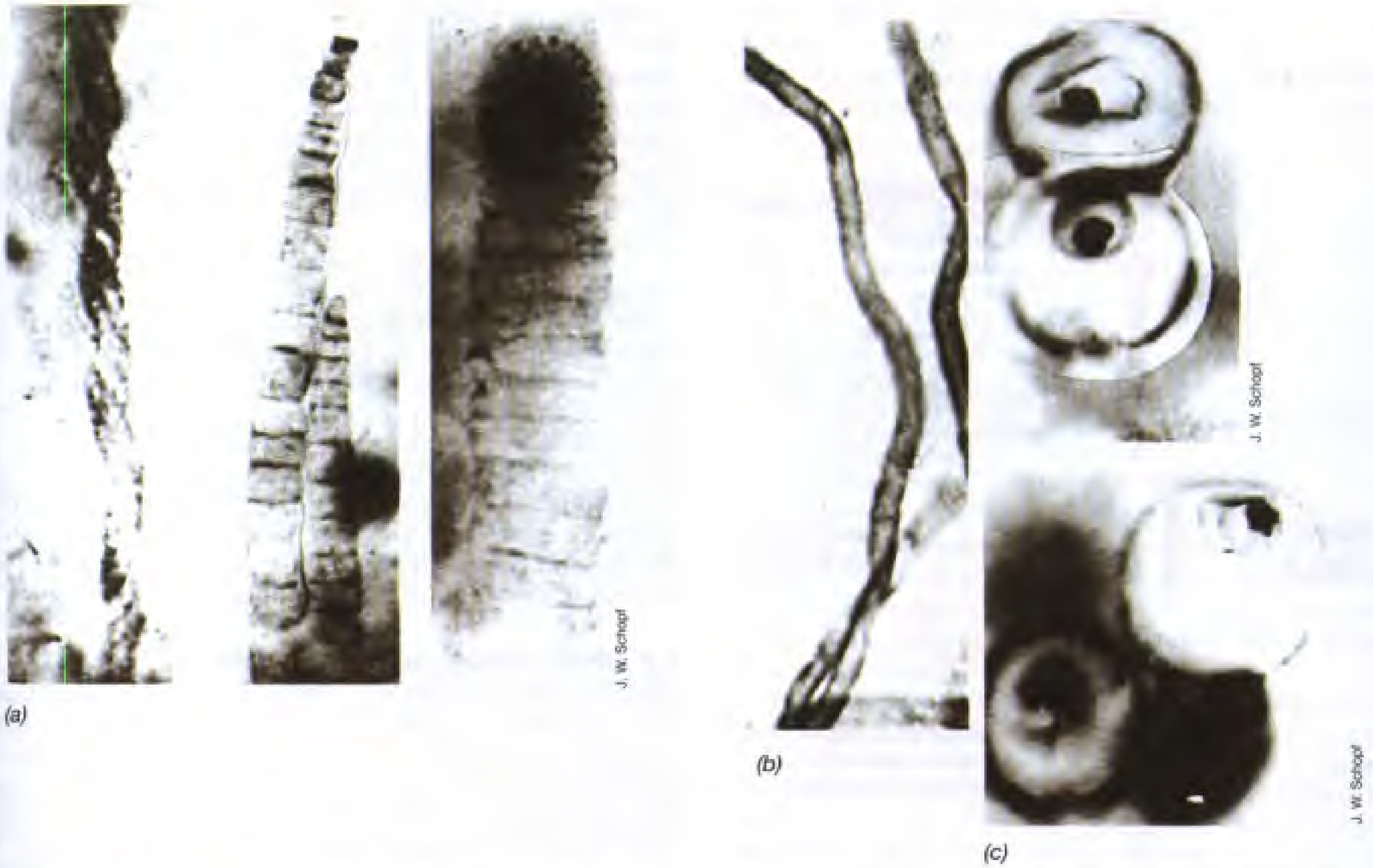


Figura 11.3 Procariotas y eucariotas fósiles procedentes de rocas más recientes que las mostradas en la Figura 11.1. Las cuatro fotografías (a) (aumento, 2000×) y (b) (aumento, 920×) muestran microorganismos procarióticos fósiles de Bitter Springs, una formación rocosa en el centro de Australia, de unos 1000 millones de años de antigüedad. Estas formas tienen una semejanza sorprendente con cianobacterias filamentosas modernas, y quimiolitotrofos *filamentosos* del azufre. Las dos micrografías en (c) (aumento, 2000×) muestran microfósiles, posiblemente de un alga eucariótica. La estructura celular es muy similar a la de ciertas algas verdes modernas, tal como *Chlorella* sp. Proceden de la misma formación rocosa que los organismos procarióticos.

- ✓ ¿Cómo era la atmósfera de la Tierra primitiva comparada con la del planeta actual?
- ✓ ¿Cómo se formaron los compuestos bioquímicos primitivos?

11.2 La vida primitiva: el mundo con RNA, códigos moleculares y producción de energía

¿Qué aspecto tenía el primer *organismo* capaz de autorreplicarse? En la actualidad es imposible contestar a esta pregunta, pero a partir de lo que sabemos de las formas microbianas actuales, podemos afirmar que las entidades autorreplicativas más simples necesitaban un mecanismo para obtener energía y alguna forma de herencia para hacer copias de sí mismas. Pero, ¿necesitarían estos procesos una estructura *celular*? Podría extrapolarse desde el presente hacia el pasado y postular que los organismos primitivos se parecían a las células modernas, aunque con muy pocos genes con limitadas capacidades para la transcripción y la traducción. Incluso una estructura de este tipo podría haber sido relativamente compleja, probablemente mucho más compleja que las primeras entidades autorreplicativas. ¿Cómo eran estas criaturas? Tras el descubrimiento de que ciertos tipos de ácido ribonucleico (RNA) son catalíticos (*véase* Sección 7.12), muchos científicos actuales creen que las formas de vida más primitivas carecían totalmente de DNA, contenían tan sólo unas cuantas, si es que alguna, proteínas, y consistían principalmente de RNA (Figura 11.4). Digamos simplemente que era la edad de la **vida del RNA**, donde el RNA era tanto el agente catalizador como el código genético.

La vida con RNA

En el mundo con RNA, las moléculas de RNA habrían funcionado con el fin exclusivo de replicarse a sí mismas y, probablemente, habrían llevado a cabo un número mínimo de reacciones catalíticas necesarias para esta finalidad (Figura 11.4). Estudios derivados de varias ribozimas catalíticas de RNA (*véase* Sección 7.12) han demostrado que pueden catalizar varias reacciones, tales como la síntesis de nucleótidos a partir de un azúcar y una base nitrogenada. Así, un periodo de vida con RNA podría haber precedido a la vida celular. Estas formas de vida con RNA podrían haber evolucionado hacia las primeras formas de vida *celulares*, cuando el RNA autorreplicativo quedara encerrado en vesículas

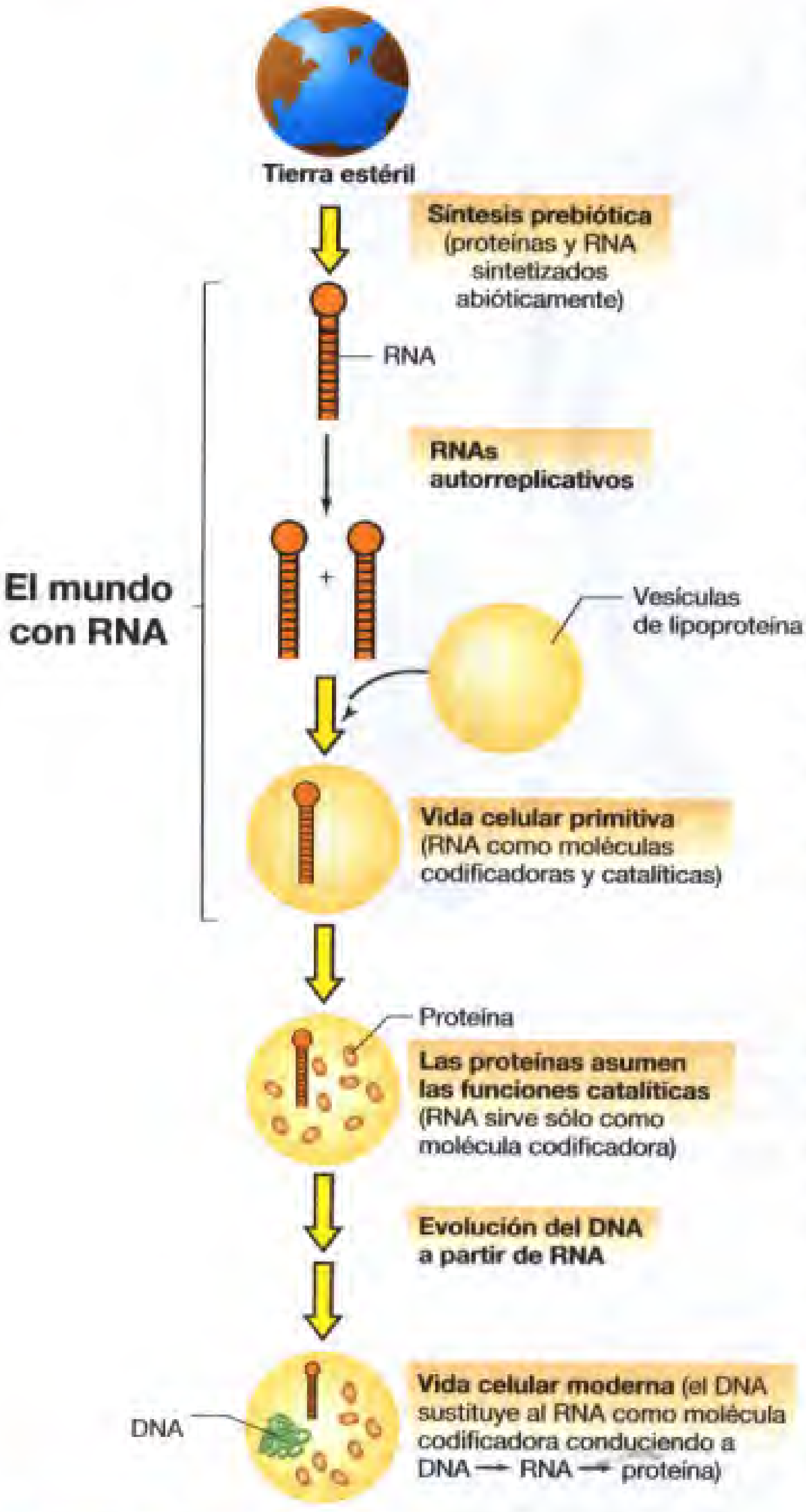

Tierra estéril
Síntesis prebiótica (proteínas y RNA sintetizados abióticamente)
RNA
RNAs autorreplicativos
El mundo con RNA
+
Vesículas de lipoproteína
Vida celular primitiva (RNA como moléculas codificadoras y catalíticas)
Proteína
Las proteínas asumen las funciones catalíticas (RNA sirve sólo como molécula codificadora)
Evolución del DNA a partir de RNA
DNA
Vida celular moderna (el DNA sustituye al RNA como molécula codificadora conduciendo a DNA → RNA → proteína)

Figura 11.4 Escenificación hipotética de la evolución de las formas de vida celulares a partir de las formas de vida con RNA. Los RNAs autorreplicativos podían haber llegado a ser entidades celulares mediante su integración estable en vesículas de lipoproteína. Con el tiempo, las proteínas reemplazaron las funciones catalíticas del RNA y el DNA reemplazó sus funciones de codificación.

de lipoproteína (Figura 11.4). Estas estructuras parecidas a las células podían haber surgido mediante la agregación espontánea de moléculas de lípidos y de proteínas para formar estructuras membranosas en cuyo interior quedaron atrapados los RNA y otros precursores de biomoléculas clave. Esta etapa pudo haber ocurrido un sinnúmero de veces en la Tierra primitiva para volver a extinguirse, pero, finalmente, los constituyentes apropiados y las circunstancias adecuadas coincidieron y surgió un organismo celular primitivo. Aunque carecía aún de DNA y procesaba tan sólo proteínas producidas abióticamente, esta forma de vida celular se asemejaría en otros aspectos a una célula moderna. A medida que tales formas de vida se extendieran más y más, la selección natural las conduciría hacia su posterior desarrollo evolutivo.

Los bioquímicos nos dicen que las proteínas muestran un grado de especificidad catalítica mucho mayor que el que poseen los RNAs catalíticos. Así, a medida que los organismos primitivos se hicieron bioquímicamente más complejos, se produjo una presión evolutiva hacia la utilización de las *proteínas* como principales agentes biocatalíticos. Parece probable que las proteínas surgieran gradualmente en las células, quizá en un principio acomplejadas con RNA, y a medida que la evolución seleccionó catalizadores bioquímicos más y más precisos, el RNA fue finalmente reemplazado por proteínas que se convirtieron así en las principales enzimas celulares (Figura 11.4).

La célula moderna: DNA → RNA → Proteína

El establecimiento del DNA como genoma de la célula pudo ser una consecuencia de la presión evolutiva hacia una mayor eficacia y fidelidad en la replicación de la información genética (las DNA polimerasas son más precisas que las RNA polimerasas, *véase* Sección 7.8). Además, al guardar toda la información genética en un lugar en la célula y procesar solamente la que se necesita bajo unas determinadas condiciones (esto es, al *regular la expresión génica*), las células habrían ahorrado energía, lo que incrementaría su adecuación competitiva. De alguna manera, en los estadios tempranos de la evolución microbiana, el sistema tripartito —DNA, RNA y proteína— quedó fijado en las formas de vida celulares como la mejor solución al procesamiento de la información biológica. A juzgar por las células actuales, este sistema fue un éxito evolutivo: todas las células conocidas contienen estos tres tipos de macromoléculas.

Metabolismo en los organismos primitivos

La vida es un proceso altamente ordenado. Para transformar moléculas inherentemente desordenadas en una compleja máquina biológica (la célula) se requiere energía. ¿Cómo fueron satisfechas estas demandas de energía en las entidades autorreplicativas primitivas? Hasta la aparición de las cianobacterias, el oxígeno molecular no existía en cantidades significativas en la Tierra (*véase* Figura 11.6). En consecuencia, para satisfacer las necesidades energéticas de los organismos primitivos, sólo podían ser explotados los mecanismos generadores de energía que tienen lugar bajo condiciones *anóxicas*. Esto no es un problema; tal como veremos en el Capítulo 17, las condiciones anóxicas imponen pocas restricciones a la diversidad metabólica; una variedad de mecanismos generadores de energía quimioorganotrofos y quimiolitotrofos, así como diferentes variantes de fotosíntesis, tienen lugar anóxicamente. Sin embargo, una simple reacción química en la que participa el ion ferroso (que se sabe que era abundante en la Tierra primitiva) pudo haber constituido un proceso primitivo de obtención de energía utilizado por los primeros organismos.

La reacción

$$FeS + H_2S \rightarrow FeS_2 + H_2 \quad \Delta G^{0\prime} = -42 \text{kJ/reacción}$$

se produce exotérmicamente con liberación de energía. Esta reacción también produce H_2, y se ha propuesto que este H_2 pudo haber sido utilizado por las células primitivas para originar una fuerza motriz de protones a través de una membrana, de la que una ATPasa primitiva podría haber extraído energía químicamente útil como ATP (Figura 11.5). Con H_2 como el donador de electrones, se requiere su aceptor, que bien podría haber sido azufre elemental, S^0. Como se muestra en la Figura 11.5, esta sencilla reacción acoplada habría requerido pocas enzimas y podría haber constituido un suministro ilimitado de energía de conservación en tanto existiera FeS accesible. Es sorprendente que muchas *Archaea* hipertermófilas (que, como veremos en este capítulo, son los organismos actuales más cercanos a los organismos más primitivos de la Tierra) pueden llevar a cabo este tipo de reacción. En la Tierra primitiva pudieron haber existido muchas otras formas de metabolismo anóxico, incluyendo fermentaciones y varios tipos de respiración anaeróbica, pero éstas habrían requerido más catalizadores y mayor complejidad bioquímica que la representada en la Figura 11.5.

Los organismos primitivos pudieron haber obtenido carbono de varias fuentes, tales como carbono orgánico de síntesis abiótica e incluso CO_2, un gas que era abundante en la Tierra primitiva. La utilización de dióxido de carbono debió continuarse con la evolución hacia la autotrofia, el proceso en el que el CO_2 se convierte en todos los compuestos orgánicos de la célula (*véanse* Secciones 17.6 y 17.7). La hipótesis de una «autotrofia primitiva» se sustenta en los proyectos de secuenciación de genomas microbianos (*véase* Capítulo 15), donde se ha puesto de manifiesto que la autotrofía se produce en un número de hipertermófilos que contienen un genoma pequeño que se ramifican cercan de la raíz del árbol evolutivo de la vida (*véase* Figura 11.13)

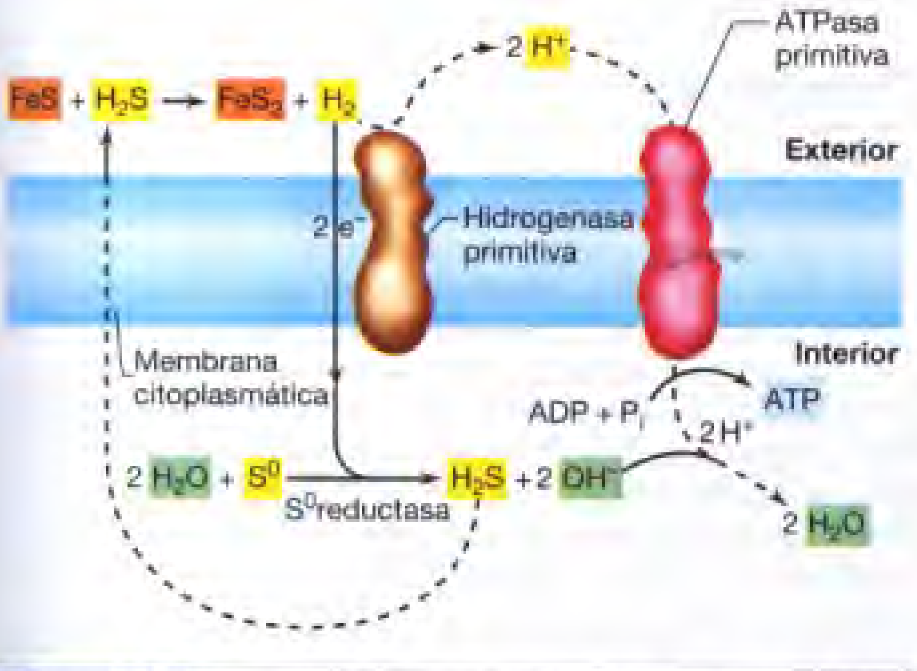


Figura 11.5 Esquema de un hipotético sistema generador de energía de las células primitivas. La formación de piritas conduce a la producción de H_2 y reducción de S^0, los cuales alimentan una ATPasa primitiva. Nótese que el H_2S sólo tiene una función catalítica. Los sustratos netos serían FeS y S^0. Nótese también como se requerirían unas cuantas proteínas diferentes. El $\Delta G^{0\prime}$ de la reacción $FeS + H_2S \rightarrow FeS_2 + H_2 = -42$ kJ.

Oxigenación de la atmósfera

Con independencia del mecanismo(s) utilizado para asimilar carbono, un hito en la historia de la Tierra lo constituye la evolución de la *fotosíntesis oxigénica* en las cianobacterias. Estos organismos aparecieron probablemente hace 3000 millones de años, pero el O_2 que produjeron no se acumuló en la atmósfera debido a la gran cantidad de sustancias reductoras (como FeS) todavía presentes que reaccionaban espontáneamente con el O_2 para formar H_2O. Es altamente probable que las cianobacterias evolucionaran a partir de prototrofos anoxigénicos mediante el desarrollo de un fotosistema que pudiera utilizar el H_2O como un donador de electrones para la reducción fotosintética del CO_2, liberando O_2 como subproducto ($CO_2 + H_2O \rightarrow CH_2O + O_2$). Describiremos la bioquímica de la fotosíntesis en el Capítulo 17.

La evolución de la fotosíntesis anoxigénica tuvo enormes consecuencias sobre el ambiente de la Tierra ya que, a medida que se acumuló el O_2, la atmósfera cambió de anóxica a óxica (Figura 11.6). Al existir abundancia de O_2 como aceptor de electrones pudieron evolucionar los organismos aeróbicos. Estos organismos eran capaces de obtener más energía de la oxidación de compuestos orgánicos que los anaeróbicos (*véase* Capítulo 17), lo que permitió alcanzar densidades de población más altas e incrementó las posibilidades de evolución de nuevos tipos de organismos y esquemas metabólicos. Existe buena evidencia, procedente del registro fósil, de que cuando la atmósfera de la Tierra se hizo oxidante la velocidad de la evolución se incrementó enormemente, lo que condujo a la aparición de microorganismos eucarióticos con orgánulos, y, a partir de ellos, a la rápida diversificación de los metazoos (organismos pluricelulares) y, finalmente, a la aparición de plantas y animales superiores (*véanse* Figura 11.13 y Sección 11.8).

Otra consecuencia importante de la aparición del O_2 fue la formación de ozono (O_3), una sustancia que suministra una barrera que impide a la intensa radiación ultravioleta del Sol alcanzar la Tierra. Cuando el O_2 se somete a radiación ultravioleta de onda corta se convierte en O_3, el cual absorbe fuertemente hasta longitudes de onda de 300 nm. Hasta que se formó un escudo de ozono, la evolución pudo haber continuado en lugares protegidos de la radiación directa del Sol, como en los océanos o debajo de las rocas, ya que la intensa radiación UV habría causado daño letal al DNA. Sin embargo, después de la producción fotosintética de O_2 y el posterior desarrollo de la capa de ozono, los organismos pudieron expandirse por la superficie de la Tierra, permitiendo la aparición de una mayor diversidad de organismos vivos. Un resumen de las etapas que pudieron producirse en la evolución biológica y en la «oxigenación de la Tierra» se muestran en la Figura 11.6.

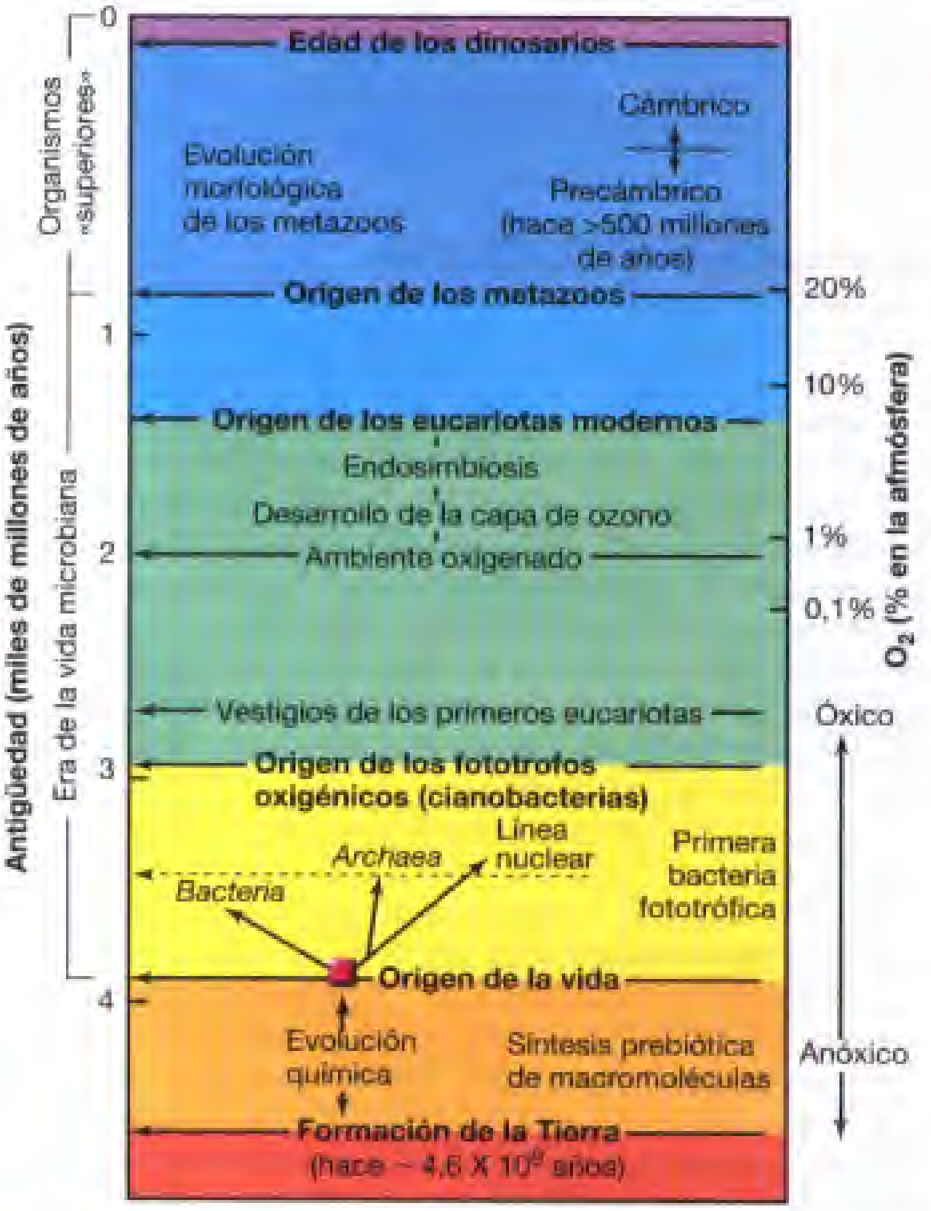

Antigüedad (miles de millones de años)
Organismos «superiores»
Era de la vida microbiana
0
1
2
3
4
Edad de los dinosarios
Cámbrico
Precámbrico (hace >500 millones de años)
Evolución morfológica de los metazoos
Origen de los metazoos
Origen de los eucariotas modernos
Endosimbiosis
Desarrollo de la capa de ozono
Ambiente oxigenado
Vestigios de los primeros eucariotas
Origen de los fototrofos oxigénicos (cianobacterias)
Línea nuclear
Archaea
Bacteria
Primera bacteria fototrófica
Origen de la vida
Evolución química
Síntesis prebiótica de macromoléculas
Formación de la Tierra (hace ~ 4,6 X 10^9 años)
20%
10%
1%
0,1%
O_2 (% en la atmósfera)
Óxico
Anóxico

Figura 11.6 Principales acontecimientos de la evolución biológica. La posición de los estadios de la escala temporal son aproximados. Nótese como la oxigenación de la atmósfera, debida al metabolismo de las cianobacterias, fue un proceso gradual a lo largo de un periodo de unos 2000 millones de años. Nótese también que durante la mayor parte de la historia de la Tierra, sólo existieron formas de vida microbiana. Aunque no existe un registro microfósil, la prueba microquímica de las células eucarióticas se remonta a 2700 millones de años.

✓ *11.2 Revisión de conceptos*

Las primeras «formas de vida» pueden haber sido RNAs autorreplicativos. Los primeros organismos celulares probablemente emplearon una estrategia simple para la obtención de la energía. El metabolismo primitivo fue anaerobio y posiblemente quimiolitotrófico, explotando las abundantes fuentes de FeS y H_2S presentes. La fotosíntesis oxigénica condujo al desarrollo de un ambiente óxico y a una gran explosión evolutiva.

- ✓ ¿Qué prueba respalda el concepto de un periodo de «vida con RNA» y por qué las formas de vida con RNA no han sobrevivido hasta el presente?
- ✓ ¿Cómo pudieron las células primitivas obtener energía de FeS + H_2S?
- ✓ ¿Por qué la evolución de las cianobacterias fue una etapa crítica en la evolución?

11.3 Orgánulos y eucariotas: endosimbiosis

En el Capítulo 2, se dio una ligera idea de la diversidad microbiana eucariótica (*véase* Sección 2.6). En el Capítulo 14, se examinarán los microorganismos eucarióticos con más detalle. Ahora, consideraremos cómo surgió la célula eucariótica actual con su estructura interna característica: el núcleo rodeado por una unidad de membrana y los orgánulos.

Origen del núcleo

Las células eucarióticas primitivas eran estructuralmente simples y se parecían a las células procarióticas actuales ya que carecían de mitocondrias, cloroplastos y núcleo rodeado por membrana. De hecho, en el Capítulo 14, veremos que tales células existen aún en la actualidad. A medida que las células en la línea eucariótica de descendencia se hicieron mayores, aparecieron el núcleo y el aparato mitótico, a la vez que el DNA, se fraccionaron en unidades discretas (cromosomas). Los cromosomas pueden haber surgido para asegurar la replicación y la partición ordenada del DNA a medida que los genomas primitivos se hicieron más grandes, hasta llegar a un punto en el que su replicación en forma de una única molécula (como en procariotas) no era viable. El desarrollo del núcleo eucariótico también facilitó la aparición de los enormes genomas que necesitaban los eucariotas microbianos de mayor tamaño (y mucho más tarde, los organismos pluricelulares), e hizo posible la recombinación de genomas mediante la reproducción sexual (*véanse* Secciones 2.2 y 14.6). No existe una razón obvia por la que los organismos primitivos necesitaran estos orgánulos, que probablemente aparecieron más tarde. En realidad, incluso actualmente, se conocen microorganismos eucarióticos que carecen de mitocondrias y cloroplastos (*véase* Sección 14.8), lo que indica que estos orgánulos no son esenciales para la función de la célula eucariótica.

Endosimbiosis

Existen pruebas concluyentes en favor de la teoría de que la célula eucariótica moderna (con orgánulos) evolucionó en etapas mediante la incorporación estable de simbiontes quimioorganotrofos y fototrofos del dominio *Bacteria* (Figura 11.7). Esta teoría, llamada **teoría endosimbiótica** (*endo* significa «dentro») de la evolución eucariótica, postula que una bacteria aeróbica estableció su residencia estable dentro del citoplasma de un eucariota primitivo y le suministró energía, a cambio de un ambiente protegido y un aporte constante de nutrientes (Figura 11.7). Este simbionte fue el precursor de la mitocondria moderna. De igual manera, la adquisición por endosimbiosis de un fototrofo oxigénico habría conferido propiedades fotosintéticas a un eucariota primitivo, de manera que ya nunca dependería de compuestos orgánicos para el suministro de energía. El endosimbionte fototrófico fue el precursor del cloroplasto moderno (Figura 11.7). Algunas células eucarióticas nunca incorporaron endosimbiontes o bien lo hicieron y luego, por alguna razón, los perdieron; en cualquier caso, estas líneas permanecieron competitivas y generaron parientes modernos que contienen un núcleo rodeado de una mem-

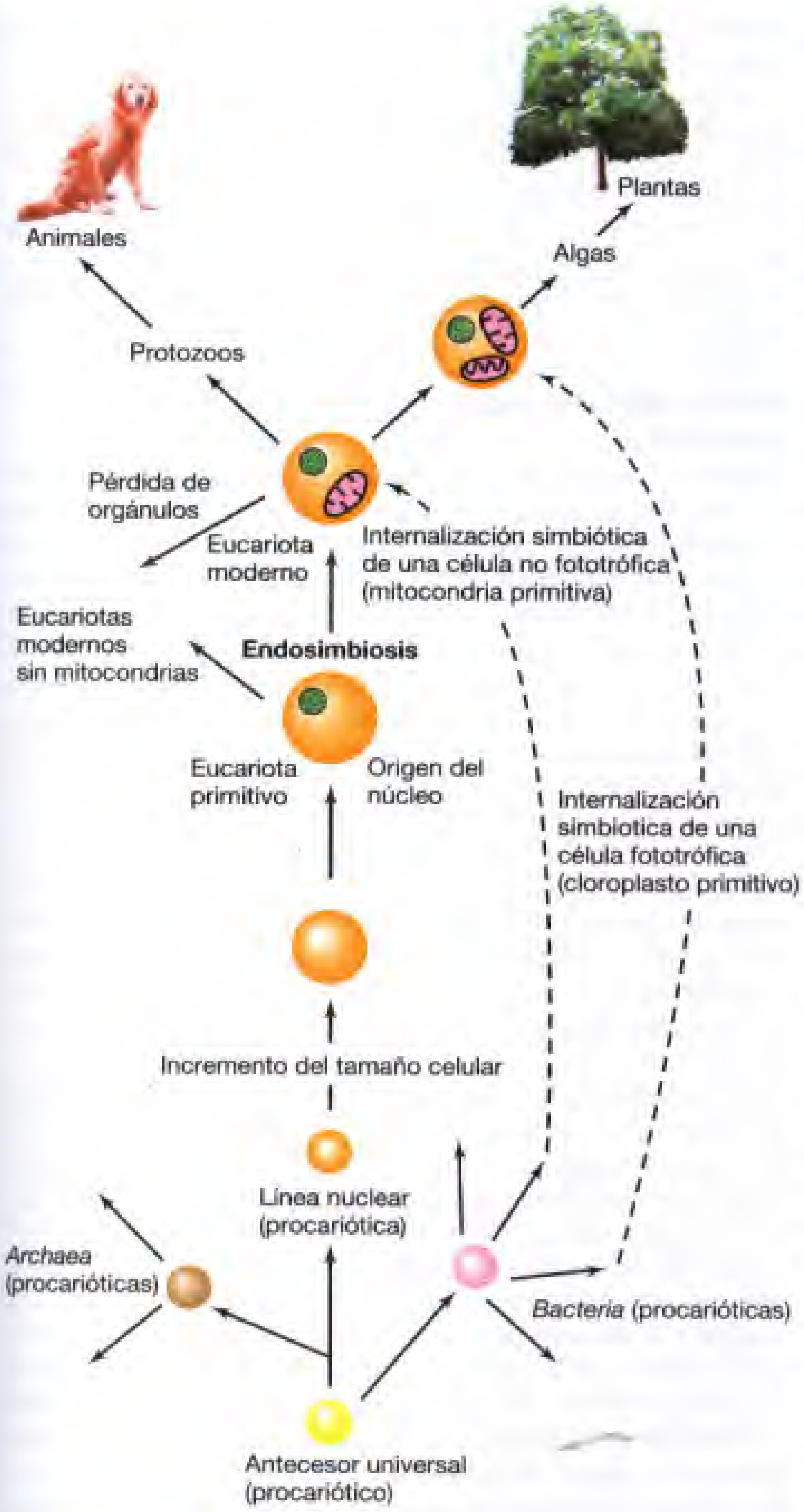

Animales
Plantas
Algas
Protozoos
Pérdida de orgánulos
Eucariota moderno
Internalización simbiótica de una célula no fototrófica (mitocondria primitiva)
Eucariotas modernos sin mitocondrias
Endosimbiosis
Eucariota primitivo
Origen del núcleo
Internalización simbiotica de una célula fototrófica (cloroplasto primitivo)
Incremento del tamaño celular
Línea nuclear (procariótica)
Archaea (procarióticas)
Bacteria (procarióticas)
Antecesor universal (procariótico)

Figura 11.7 Origen de los eucariotas actuales por endosimbiosis. Nótese cómo los orgánulos se originaron a partir de *Bacteria* en lugar de *Archaea*. Es muy poco probable que la endosimbiosis fuera un acontecimiento único y probablemente ocurriera en varios tipos celulares de la línea nuclear. Nótese, sin embargo, cómo algunos procariotas primitivos nunca experimentaron endosimbiosis, o bien, perdieron permanentemente sus simbiontes, pero mantuvieron las propiedades básicas de las células eucarióticas. Existen actualmente ejemplos de tales eucariotas, todos ellos microbianos (*véase* Capítulo 14). El incremento en el tamaño de las celulas en la línea nuclear, condujo a la evolución de genomas de mayor tamaño y probablemente también a la evolución del núcleo permitiendo la replicación ordenada y la repartición de dichos genomas. Compare esta figura con la Figura 11.13 donde se muestran los linajes de *Bacteria* a partir de los que se originaron los orgánulos (*véase* Sección 14.4).

brana pero carecen de orgánulos (*véanse* Figura 11.7 y Sección 14.8).

¿Qué prueba sólida respalda la noción de que las mitocondrias y los cloroplastos fueron alguna vez *Bacteria*, como postula la teoría endosimbiótica? Muchas. En primer lugar, tanto la mitocondria como el cloroplasto contienen ribosomas que son claramente de tipo procariótico (*véase* Tabla 7.4). Además, los ribosomas de estos orgánulos poseen secuencias del RNA ribosómico (*véase* Sección 11.5) características de determinadas *Bacteria*, y su función es inhibida por los mismos antibióticos que afectan a la función del ribosoma de *Bacteria* de vida libre (*véase* Sección 14.5). En segundo lugar, las mitocondrias y los cloroplastos también contienen una pequeña cantidad de DNA dispuesto en una forma circular covalentemente cerrada, típica de procariotas (*véase* Sección 2.2). Aunque se conocen otras conexiones entre orgánulos y *Bacteria* (*véase* Sección 14.5), las mitocondrias y los cloroplastos conservan claramente las características de un estado previo de vida libre. Estas factorías de energía confirieron tales propiedades a las células eucarióticas, que se produjo la situación adecuada para una explosión de diversidad biológica. Y así, el periodo comprendido entre hace 1500 millones de años y el presente fue testigo de la aparición y diversificación de los microorganismos eucarióticos unicelulares y los metazoos, que culminó en los estructuralmente complejos plantas y animales superiores (*véanse* Figuras 11.6 y 11.13).

Evolución biológica y escala de tiempo geológico

El periodo desde el origen del primer metazoo hasta el presente representa aproximadamente una sexta parte del tiempo total en que la vida ha existido sobre la Tierra. O dicho de otra manera, cinco sextos de la historia biológica de la Tierra estuvieron restringidos a vida microbiana, siendo la mayor parte de este periodo exclusivo de procariotas (*véase* Figura 11.6). Sin embargo, dado que los metazoos han dejado un registro fósil considerable y muy diverso, nuestro conocimiento de la evolución biológica desde la aparición de los metazoos hasta el presente excede con mucho nuestro conocimiento acerca de las relaciones evolutivas entre los procariotas. Sin embargo, esto ha cambiado dramáticamente en los últimos 20 años con la utilización de los métodos moleculares para reconocer las filogenias microbianas. Consideraremos algunos de estos métodos en las siguientes secciones.

✓ 11.3 Revisión de conceptos

El núcleo eucariótico y el aparato mitótico surgieron probablemente como una necesidad para asegurar la partición ordenada del DNA en los organismos con genomas grandes. Las mitocondrias y los cloroplastos, los principales orgánulos productores de energía de los eucariotas, surgieron por asociación simbiótica de procariotas del dominio *Bacteria* en el interior de células eucarióticas, un proceso llamado endosimbiosis.

- ✓ ¿Cuándo aparecieron los eucariotas en el tiempo geológico? ¿Y los metazoos?
- ✓ ¿Qué dato sustenta la idea de que los orgánulos fueron en el pasado especies de vida libre del dominio *Bacteria*?

II RELACIONES EVOLUTIVAS ENTRE LOS MICROORGANISMOS

Consideraremos ahora la **filogenia** de los microorganismos deducida de los estudios moleculares de los ácidos nucleicos. El principal tema aquí será la comparación de secuencias del RNA estructural de los ribosomas. Los resultados de estos estudios han generado la primera imagen real de la filogenia microbiana y han proporcionado nuevas herramientas de investigación a la ecología microbiana y al diagnóstico clínico.

11.4 Cronómetros evolutivos

En la actualidad está claro que ciertas macromoléculas son cronómetros evolutivos, es decir, medidas del cambio evolutivo. Se ha demostrado convincentemente que la **distancia evolutiva** entre dos organismos puede determinarse por las diferencias en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos de macromoléculas homólogas aisladas de cada uno de ellos. Esto se debe a que el número de diferencias en la secuencia de una macromolécula es proporcional al número de cambios mutacionales estables fijados en el DNA que codifica esa molécula en ambos organismos. La evolución se produce a medida que las mutaciones quedan fijadas en las diferentes poblaciones, siendo la biodiversidad el resultado final.

Elección del cronómetro adecuado

Para determinar las verdaderas relaciones evolutivas entre organismos, es esencial elegir las moléculas adecuadas para los estudios de secuenciación. Esto es importante por varios motivos. Primero, la molécula debe estar *universalmente distribuida* en el grupo elegido para ser estudiado. Segundo, deben ser *funcionalmente homólogos* en cada organismo; las comparaciones filogenéticas deben realizarse con moléculas de *idéntica* función. Tercero, resulta crucial poder *alinear* apropiadamente las dos moléculas a fin de identificar regiones tanto con homología como con variación de secuencia. Finalmente, la secuencia de la molécula elegida debería cambiar con una velocidad proporcional a la distancia filogenética que se va a determinar. Y, de hecho, cuanto mayor sea la distancia filogenética a determinar, *menor* será la velocidad de cambio de la molécula; demasiado cambio tiende a enturbiar el registro evolutivo.

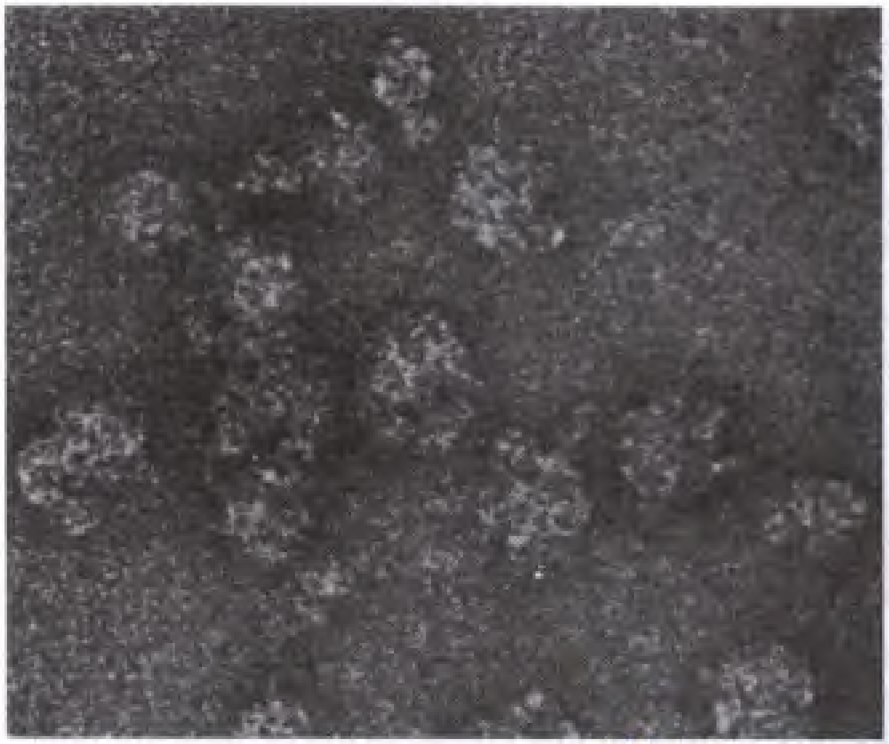
Se han evaluado muchas moléculas como cronómetros moleculares y con ellas se han realizado estudios de comparación de secuencias a fin de generar árboles filogenéticos. Estas moléculas son: varios citocromos, proteínas de hierro y azufre tales como las ferredoxinas, y genes de otras proteínas y de los RNAs ribosómicos. Sin embargo, los genes que codifican los RNAs ribosómicos, componentes clave del sistema de traducción (*véanse* Secciones 7.13-7.16); la ATPasa, complejo enzimático de membrana que puede sintetizar e hidrolizar ATP (*véase* Sección 5.12); y la RecA, proteína requerida para la recombinación genética (*véase* Sección 10.5) son los que han proporcionado la información genética más significativa sobre los microorganismos. Todas estas moléculas eran probablemente esenciales incluso para las células más primitivas y así, la variación de secuencia en los genes que las codifican, nos permiten profundizar en el registro evolutivo. Centraremos nuestro estudio en el cronómetro molecular más ampliamente utilizado, el RNA ribosómico (Figura 11.8).

RNAs ribosómicos como cronómetros evolutivos

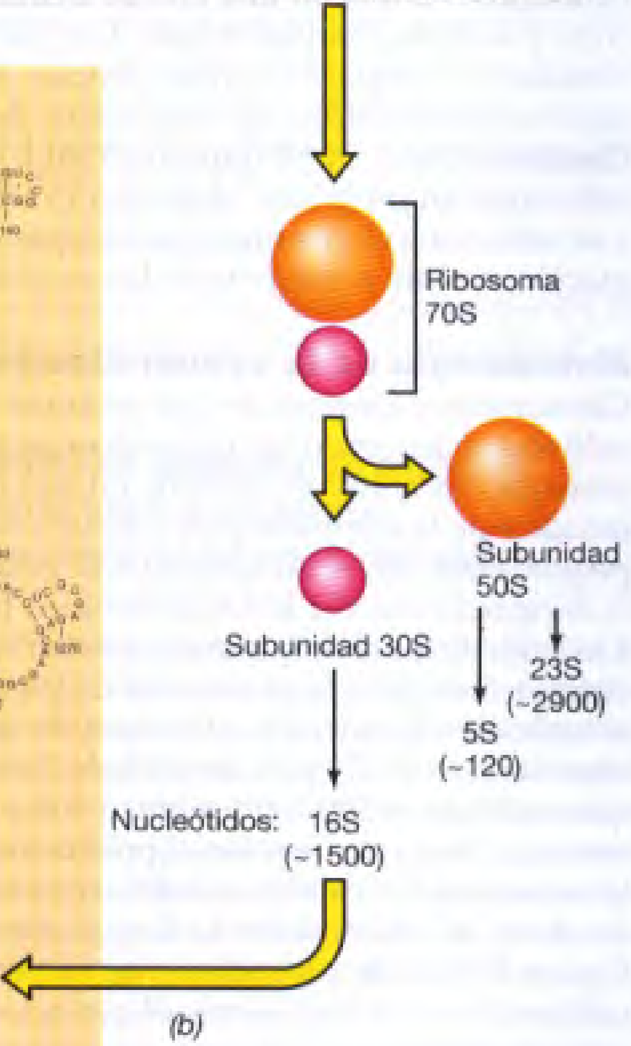
Debido a la probable antigüedad de la maquinaria sintetizadora de proteínas, y por varias otras razones, los RNAs ribosómicos son moléculas excelentes para discernir las relaciones evolutivas entre los seres vivos. Los RNAs ribosómicos son funcionalmente constantes, están universalmente distribuidos y su secuencia está moderadamente bien conservada a través de amplias distancias filogenéticas. También, dado el elevado *número* de diferentes secuencias posibles de moléculas grandes, tales como los RNAs ribosómicos, la similitud de dos secuencias indica *alguna* relación filogenética. Sin embargo, es el *grado* de semejanza de las secuencias del RNA ribosómico de dos organismos lo que indica su parentesco evolutivo relativo. A partir del análisis comparativo de secuencias, se pueden construir las genealogías moleculares que conducen a los árboles filogenéticos; éstos muestran la posición evolutiva más probable existente entre los organismos (*véase* Figura 11.13).

Recordemos la estructura del ribosoma (Figura 11.8). Hay tres moléculas de RNA ribosómico, que en procariotas tienen tamaños de 5S, 16S y 23S («S» indica unidades de masa «Svedberg»). Los rRNAs bacterianos grandes, 16S (Figura 11.8*c*) y 23S (aproximadamente 1500 y 2900 nucleótidos, respectivamente) contienen varias regiones de secuencia altamente conservada que resulta útil para obtener alineamientos de secuencia apropiados, pero, al mismo tiempo, la variabilidad de secuencia suficiente en otras regiones de la molécula para servir como excelentes cronómetros filogenéticos. Dado que el RNA 16S es más manejable experimentalmente que el RNA 23S, se ha utilizado preferentemente para desarrollar la filogenia tanto de procariotas como de eucariotas. (En eucariotas se secuencia el homólogo del rRNA 16S, es decir, el rRNA 18S de los ribosomas 80S.) Dado que los rRNA 16S y 18S proceden de la *subunidad pequeña* (*30S* o *40S*) del ribosoma (Figura 11.8*b*), el acrónimo secuenciación de SSU (por small subunit; subunidad pequeña) es sinónimo de la secuenciación de 16S o 18S. La base de datos de las secuencias del rRNA en el Proyecto de Base de Datos del Ribosoma (RDP) contiene más de 24 000 (16 000 secuencias 16S alineadas y 8000 secuencias 18S alineadas) y puede accederse a ella a través de Internet (http://rdp.cme.msu.edu/html/). Carl Woese en la Universidad de Illinois introdujo en los años 70 el uso de la subunidad pequeña del rRNA como herramienta filogenética y el método se utiliza universalmente en la actualidad.

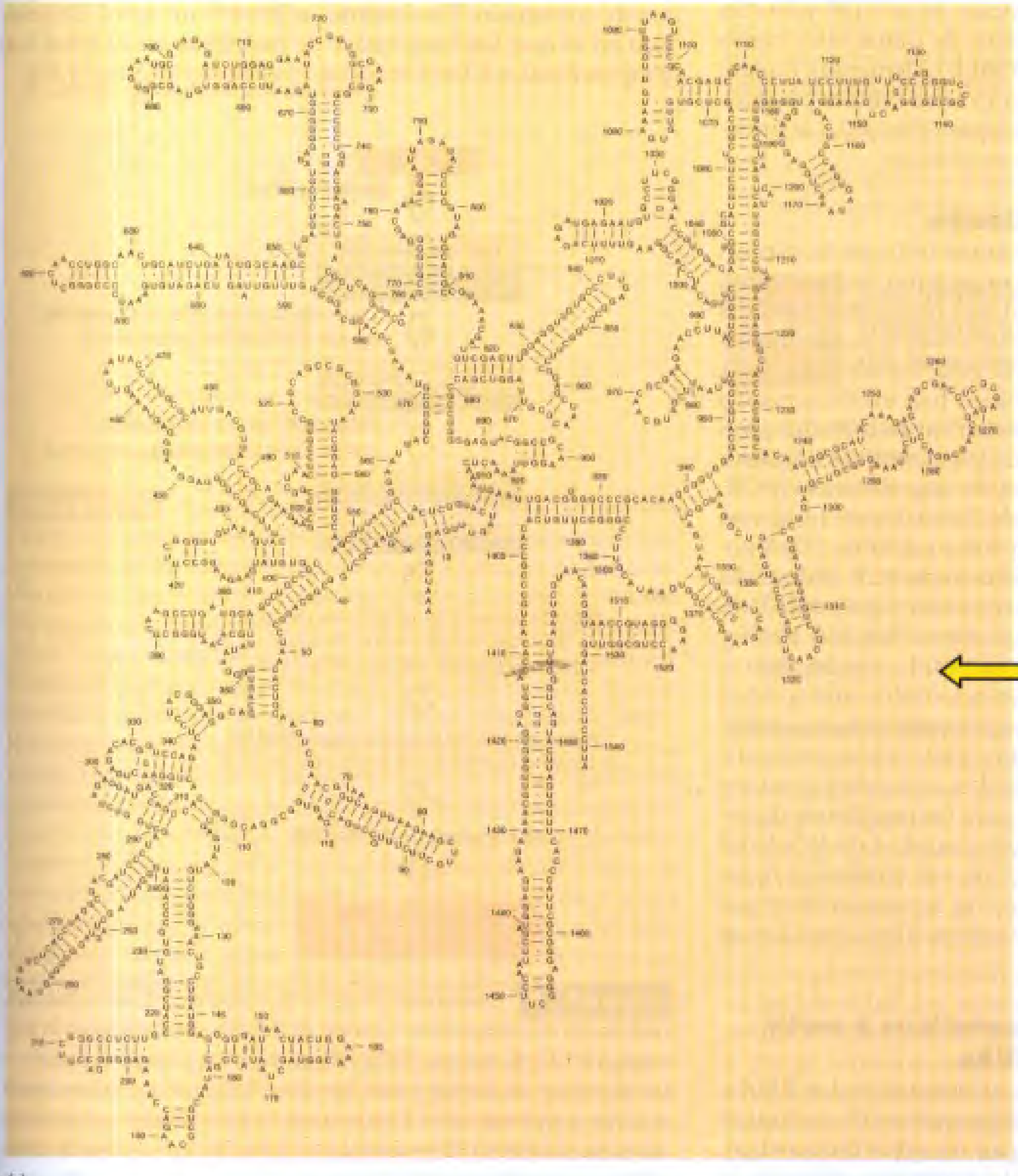
Figura 11.8 RNA ribosómico. (a) Micrografía electrónica de ribosomas 70S de *Escherichia coli*. (b) Partes del ribosoma; 5S, 16S y 23S indican las diferentes formas del RNA de la subunidad pequeña del ribosoma. (c) Estructura primaria y secundaria del RNA ribosómico 16S (rRNA). Éste es el rRNA 16S de *Escherichia coli (Bacteria)*; en general, el rRNA 16S de *Archaea* es similar en cuanto a estructura secundaria (plegamiento) pero presenta numerosas diferencias en estructura primaria (secuencia). La molécula correspondiente de eucariotas es el rRNA 18S presente en los ribosomas citoplasmáticos. Usando como iniciadores oligonucleótidos específicos de las regiones conservadas del rRNA de organismos de uno u otro dominio (*véase* Tabla 11.1), es posible, mediante técnicas de PCR, amplificar RNAs de la subunidad pequeña de células de un dominio particular presente en una mezcla que contenga células de otros dominios (*véase* Figura 11.9). Esto ha permitido estimar la diversidad de un dominio particular de la vida en un hábitat utilizando técnicas de «muestreo de comunidades» (*véanse* Sección 18.5 y Figura 18.14). Además, la obtención de oligonucleótidos específicos conjugados con colorantes florescentes ha permitido desarrollar una nueva herramienta para la ecología microbiana (*véanse* Figuras 11.11, 11.12 y 11.14).



(a)



(b)



(c)

UNIVERSIDAD DE TALCA BIBLIOTECA CENTRAL

✓ 11.4 Revisión de conceptos

Las comparaciones de secuencias del RNA ribosómico son útiles para determinar las relaciones evolutivas entre organismos. Los árboles filogenéticos basados en el RNA ribosómico incluyen actualmente los principales grupos procarióticos y eucarióticos.

- ✓ ¿Por qué el RNA ribosómico es un buen cronómetro evolutivo?
- ✓ ¿Qué es el RDP?

11.5

Secuencias del RNA ribosómico y evolución celular

Los métodos para obtener secuencias del RNA ribosómico y generar árboles filogenéticos son actualmente bastante rutinarios e implican una combinación de biología molecular y análisis computerizado. Las nuevas secuencias generadas se comparan con secuencias en la RDP y/o con secuencias obtenidas de otras bases de datos tales como GenBank (USA), DDSS (Japón) o EMLB (Alemania). Luego, utilizando un programa, se generan varios árboles posibles y se selecciona el que mejor se «adapte» (*best fit*) a la información evolutiva presente en las secuencias.

Metodología de la secuenciación

Comencemos asumiendo que estamos trabajando con un cultivo axénico (puro) de un microorganismo, aunque como veremos, los cultivos axénicos no son necesarios para los estudios de la comparación se secuencias de la subunidad pequeña del rRNA. Al igual que la vida, los métodos para la secuenciación del RNA ribosómico han evolucionando a lo largo de los años, y aunque existen varios métodos para obtener la secuencia, la mayoría de los científicos emplean actualmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *véase* Sección 10.17) para amplificar directamente los genes que codifican el RNA ribosómico 16S a partir de DNA genómic, y luego secuencian el producto de PCR utilizando la secuenciación estándar didesoxi (nucleótidos) del DNA (es decir, la *secuenciación de Sanger, véanse* Sección 10.13 y Figura 11.9). Este procedimiento es rápido y específico y, utilizando como iniciadores oligonucleótidos sintetizados químicamente (accesibles comercialmente a bajo coste), complementarios de las secuencias conservadas en la subunidad pequeña del rRNA, pueden obtenerse grandes cantidades del producto de PCR para las reacciones de secuenciación a partir de una ínfima cantidad de DNA del cultivo microbiano (Figura 11.9). Una vez terminada la secuenciación, bien manualmente o con secuenciadores automáticos, los datos pueden analizarse mediante programas informáticos.

Generación de árboles filogenéticos a partir de las secuencias de los RNAs

A efectos de comparación de las secuencias de los RNAs, existen varios algoritmos disponibles capaces de realizar el análisis de las secuencias y construir un árbol filogenético. Sin embargo, con independencia del programa utilizado, la secuencia obtenida debe ser en primer lugar *alineada* con secuencias alineadas previamente utilizando un editor de secuencias. Entonces las secuencias alineadas son importadas en el programa de construcción de árboles elegido para realizar el examen comparativo. Dos algoritmos muy utilizados a estos efectos son: la *distancia* y la *parsimonia*. En los métodos de distancia, se alinean las secuencias, y la **distancia evolutiva** (E_D) se calcula mediante el recuento por computadora de todas las posiciones en las que exista una *diferencia* (Figura 11.10). A partir de aquí, puede construirse una matriz de distancias que muestra la E_D entre cada dos secuencias. Luego se introduce un factor de corrección de la E_D que tiene en cuenta la posibilidad de que en un lugar determinado se hayan producido varios cambios (Figura 11.10). Por ejemplo, existe una probabilidad baja, pero estadísticamente significativa, de que una base presente en un determinado lugar dos secuencias como resultado de dos acontecimientos mutagénicos, uno que inicialmente cambió la secuencia y otro que restauró la situación original. Estas posibilidades pueden estimarse y esto es lo que hace el factor de corrección. Finalmente, se genera un árbol filogenético en el que las longitudes de las líneas en el árbol son proporcionales a las distancias evolutivas (Figura 11.10).

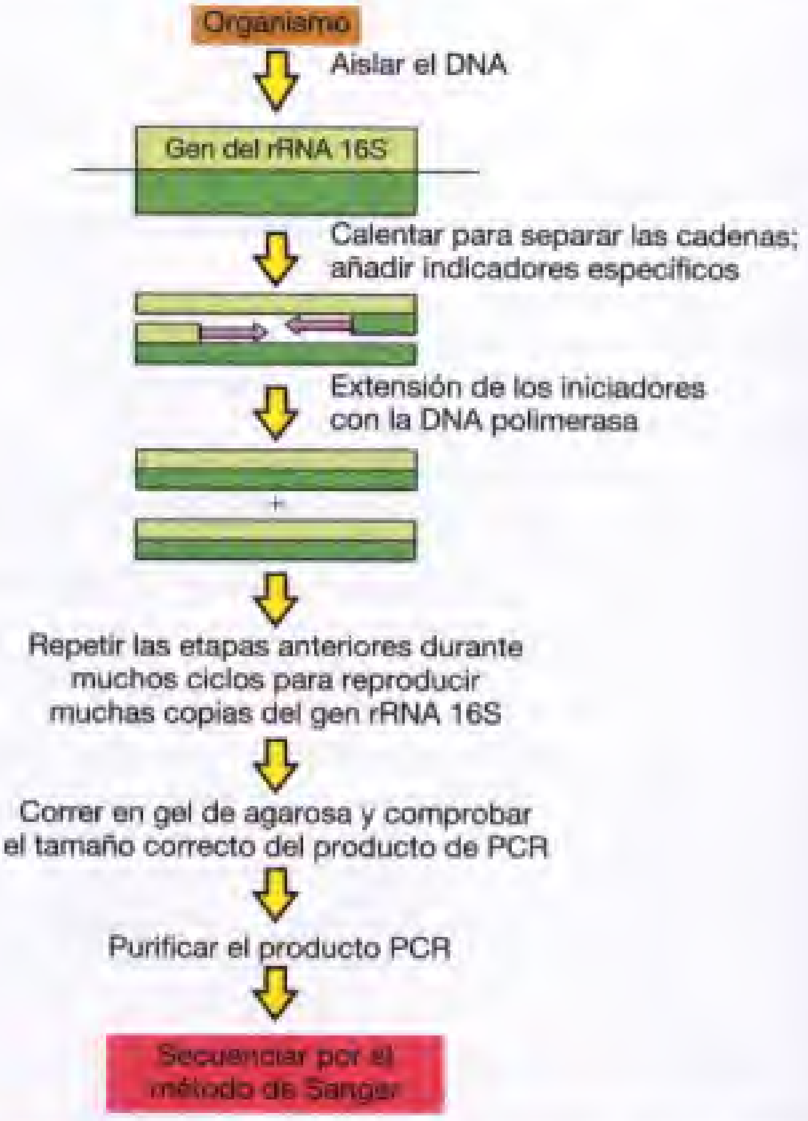
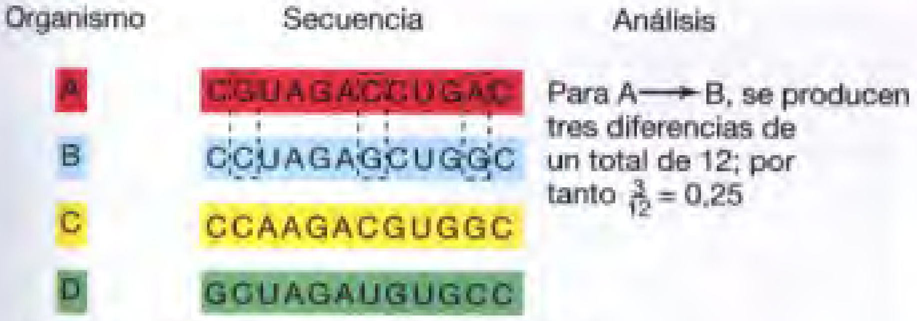
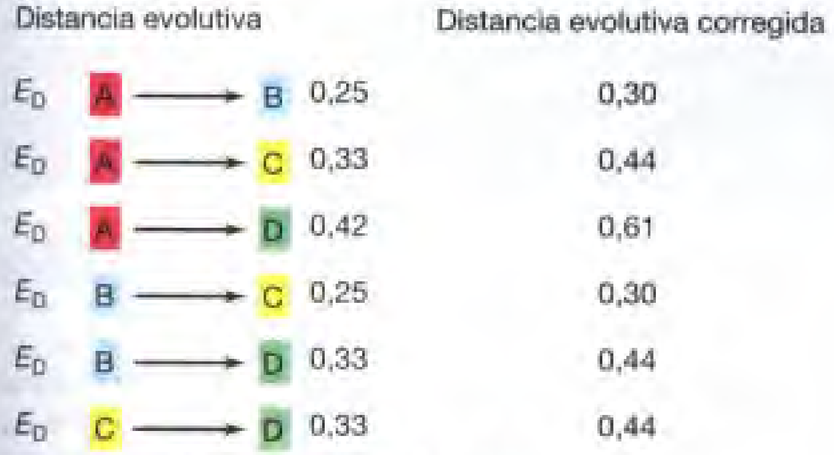

Organismo
Aislar el DNA
Gen del rRNA 16S
Calentar para separar las cadenas; añadir indicadores específicos
Extensión de los iniciadores con la DNA polimerasa
+
Repetir las etapas anteriores durante muchos ciclos para reproducir muchas copias del gen rRNA 16S
Correr en gel de agarosa y comprobar el tamaño correcto del producto de PCR
Purificar el producto PCR
Secuenciar por el método de Sanger

Figura 11.9 Secuenciación del RNA ribosómico de un cultivo axénico de un microorganismo usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El gen del rRNA 16S se amplifica y luego se secuencia por el método de Sanger (*véase* Sección 10.13). Los iniciadores añadidos son complementarios a las secuencias conservadas en uno de los dominios del rRNA 16S (*véase* Figura 11.8c). También se puede clonar el DNA que codifica el rRNA 16S tras su amplificación por PCR.

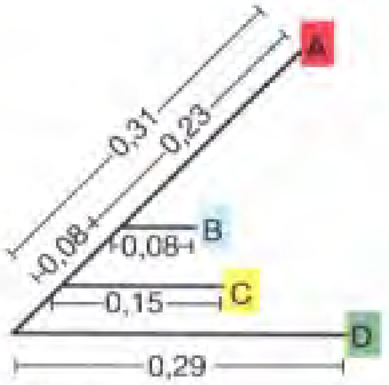

Organismo
Secuencia
Análisis
A
CGUAGACCUGAC
B
CCUAGAGCUGGC
C
CCAAGACGUGGC
D
GCUAGAUGUGCC
Para A → B, se producen tres diferencias de un total de 12; por tanto $\frac{3}{12}$ = 0,25

(a) **Alineamiento y análisis de secuencias**


Distancia evolutiva
Distancia evolutiva corregida

	Distancia evolutiva		Distancia evolutiva corregida
E_D	A → B	0,25	0,30
E_D	A → C	0,33	0,44
E_D	A → D	0,42	0,61
E_D	B → C	0,25	0,30
E_D	B → D	0,33	0,44
E_D	C → D	0,33	0,44

(b) **Cálculo de la distancia evolutiva**



(c) **Árbol filogenético**

Figura 11.10 Preparación de un árbol de distancias filogenéticas a partir de secuencias del RNA ribosómico. A efectos ilustrativos, sólo se muestran secuencias cortas. La distancia evolutiva (E_D) en (b) se calcula como el porcentaje de secuencias *no idénticas* entre los RNAs de dos organismos cualesquiera. La E_D corregida es una corrección estadística necesaria para incluir las mutaciones regresivas que restauran el genotipo original o mutaciones adicionales hacia adelante que podrían haber sucedido en el mismo sitio. El árbol (c) se genera mediante análisis computerizado de los datos para encontrar el que mejor se adapta. La longitud total de las ramas que separan dos organismos cualesquiera es proporcional a la distancia evolutiva calculada entre ellos. En los análisis reales se utiliza a menudo un proceso estadístico llamado *bootstrapping*, en el que la computadora genera cientos de versiones del árbol para confirmar que el árbol final es el que mejor se adapta al conjunto de datos. Además, inserciones de varios nucleótidos pueden separar regiones de homología de secuencia en dos organismos y estas inserciones no se consideran en los análisis reales.

La *parsimonia*, otro método común de análisis filogenético, construye árboles evolutivos basado en la premisa de que durante la divergencia evolutiva de dos líneas celulares a partir de un antecesor común, sólo se produce la *mínima cantidad* de cambios de secuencia necesarios para dicha divergencia. Al igual que los programas que calculan la distancia evolutiva, este método requiere la suma del número de diferencias en las secuencias de un conjunto particular de datos, pero el algoritmo maneja el análisis de manera algo diferente. No obstante, los árboles filogenéticos basados en la parsimonia son similares a los árboles de distancias, aunque el orden de ramificación de un árbol con el método de parsimonia pueda diferir, y frecuentemente lo hace, de su correspondiente árbol de distancias generado a partir de los mismos datos. Por tanto, ningún árbol filogenético individual tiene la «última palabra» sobre las relaciones filogenéticas de los organismos en cuestión; no obstante, los árboles filogenéticos proporcionan una buena aproximación a la verdadera filogenia del grupo.

✓ 11.5 Revisión de conceptos

La comparación de secuencias del RNA ribosómico es actualmente un procedimiento rutinario que requiere la amplificación del gen que codifica el rRNA 16S, su secuenciación y el análisis de su secuencia en relación con otras secuencias. Dos programas ampliamente utilizados para generar árboles incluyen métodos de distancia evolutiva y de parsimonia.

- ✓ ¿Qué es una *distancia evolutiva* (E_D)?
- ✓ ¿Cómo se utiliza la *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR) en la comparación de secuencias del RNA ribosómico?

11.6 Secuencias signatura, sondas filogenéticas y análisis de la comunidad microbiana

La siguiente sección introducirá el «cuadro general» de la filogenia microbiana: el árbol universal de la vida. Sin embargo, antes de que veamos cómo la secuenciación de subunidad pequeña del RNA ribosómico ha revolucionado nuestra visión de la evolución celular en los tres dominios de la vida, comentaremos algunos métodos y aplicaciones de la tecnología utilizada. Éstos incluyen las secuencias signatura y el diseño y uso de las sondas del RNA ribosómico en ecología microbiana y en el diagnóstico en medicina.

Secuencias signatura

Los análisis por computadora de las secuencias del RNA ribosómico han puesto de manifiesto las denominadas **secuencias signatura**, cortos oligonucleótidos exclusivos de ciertos grupos. Por ejemplo, se conocen secuencias signatura específicas de cada uno de los dominios de la vida (Tabla 11.1). Además, se conocen signaturas que definen un grupo específico dentro de un dominio o, en algunos casos, un género particular o incluso una única especie. Dada su exclusividad, las secuencias signatura tienen muchas utilidades. Por ejemplo, las signaturas (rúbricas) nos ayudan a ubicar a un microorganismo recién aislado o a uno que estaba mal clasificado en su grupo filogenético correcto. Pero el uso más extendido de las secuencias signatura es el diseño de sondas de nucleótidos específicos denominadas *sondas filogenéticas*.

TABLA 11.1 Secuencias signatura de RNA 16S o 18S que definen los tres dominios de la vida

Oligonucleótidos signatura[a]	Posición aproximada[b]	Frecuencia en[c]		
		Archaea	*Bacteria*	*Eukarya*
CACYYG	315	0	> 95	0
AAACUCAAA	910	3	100	0
AAACUUAAAG	910	100	0	100
YUYAAUUG	960	100	< 1	100
CAACCYYCR	1110	0	> 95	0
UCCCUG	1380	> 95	0	100
UACACACCG	1400	0	> 99	100
CACACACCG	1400	100	0	0

[a] Y, cualquier pirimidina, R, cualquier purina.

[b] Se refiere a la Figura 11.8c para el esquema de numeración del RNA 16S.

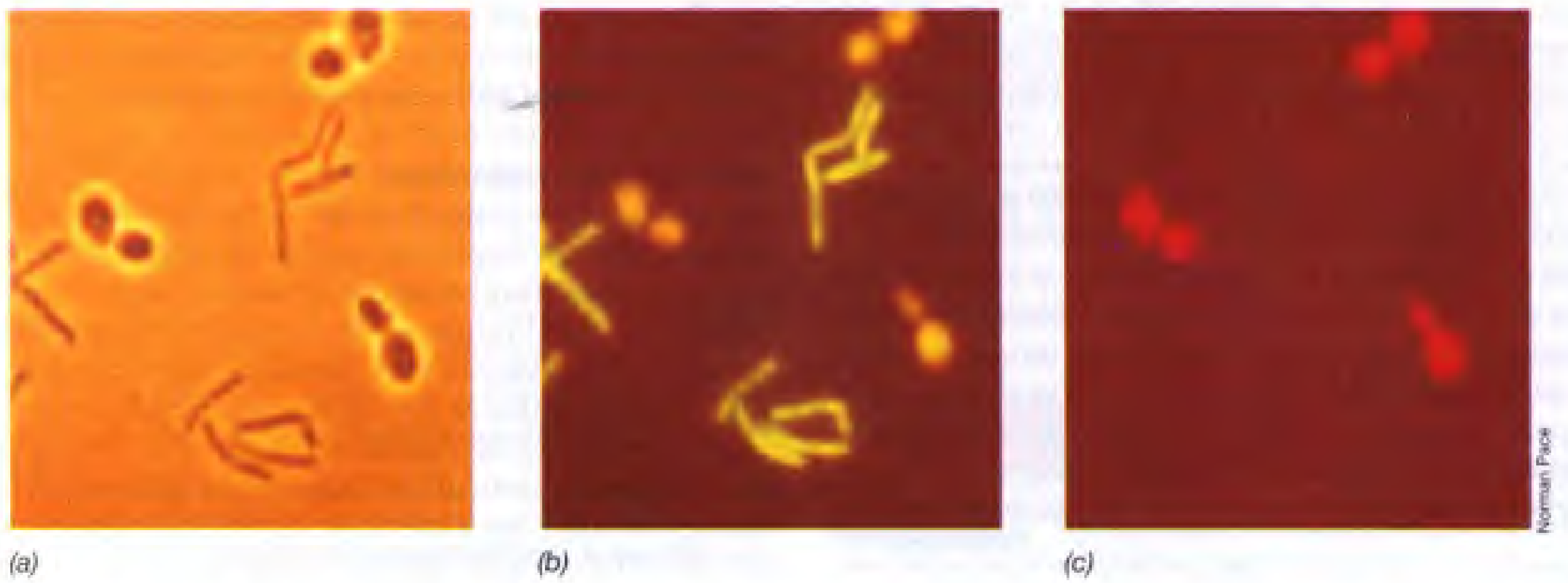
[c] La frecuencia se refiere al porcentaje de organismos de cada dominio que contengan esa secuencia.

Sondas filogenéticas y FISH

Recordemos que una sonda es una cadena de ácido nucleico que puede ser marcada y utilizada para hibridar con un ácido nucleico complementario presente en una mezcla (*véase* Sección 10.12). Las sondas pueden ser generales o específicas. Por ejemplo, pueden sintetizarse sondas de RNA ribosómico que se unan a secuencias conservadas presentes en el RNA ribosómico de todos los organismos, con independencia del dominio. Pueden diseñarse sondas algo más específicas que reaccionarán sólo con células del dominio *Bacteria* dada la signatura exclusiva presente en su RNA (Tabla 11.1). De igual manera, las sondas específicas de *Archaea* o *Eukarya* reaccionarán con las respectivas especies de uno u otro dominio. Incluso grupos importantes dentro de cada dominio, como géneros o familias (*véase* Sección 11.11) pueden ser etiquetados con sondas específicas.

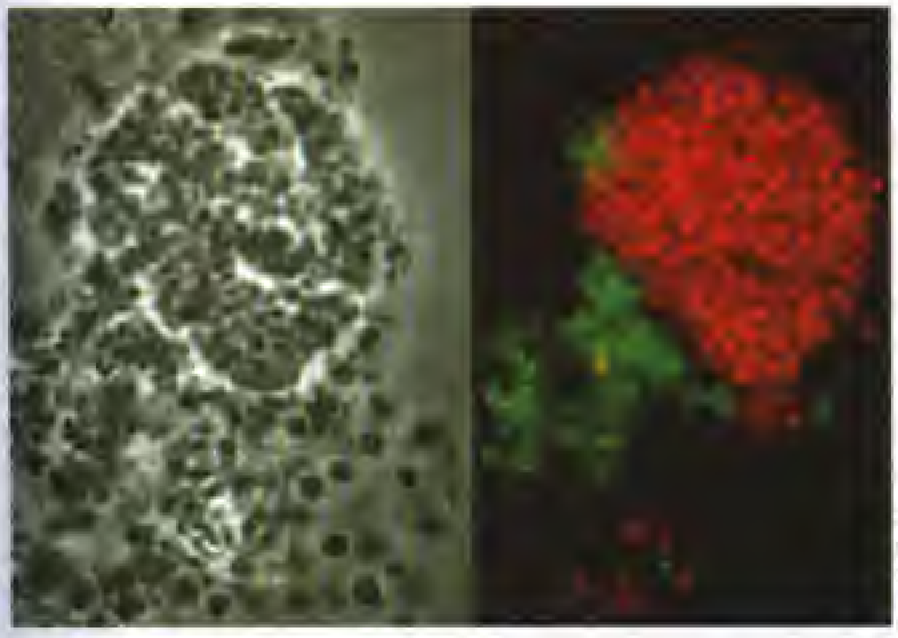
La unión de las sondas a los ribosomas celulares puede observarse microscópicamente si la sonda lleva unido un colorante fluorescente (Figura 11.11). Tratando las células con reactivos apropiados, las membranas se hacen permeables y permiten la penetración de la mezcla sonda/colorante. Una vez que la sonda hibrida con el RNA ribosómico en los ribosomas, las células se hacen uniformemente fluorescentes y pueden observarse con un microscopio de fluorescencia (Figura 11.11, *véase* también Figuras 11.12 y 11.14). Esta técnica ha sido denominada ***FISH*** por *h*ibridación *f*luorescente *in*-*s*itu, ya que puede aplicarse directamente a células en cultivo o en su ambiente natural.

La tecnología FISH se utiliza ampliamente en la ecología microbiana y en el diagnóstico clínico. En ecología, la técnica del FISH puede usarse para la identificación por microscopía y selección de los microorganismos directamente en su ambiente. Estos métodos proporcionan, por tanto, una idea de la composición de las comunidades microbianas y la función que un microorganismo específico o un grupo de organismos relacionados tienen en procesos



Norman Pace

Figura 11.11 Sondas de RNA ribosómico marcadas con fluorescencia. (a) Micrografía de contraste de fases de *Bacillus megaterium* (miembro de *Bacteria*) y la levadura *Saccharomyces cerevisiae (Eukarya)*. (b) El mismo campo, células teñidas con una sonda universal amarillo-verdosa (esta sonda reacciona con especies de cualquier dominio). (c) El mismo campo, células teñidas con una sonda eucariótica (sólo reacciona con las células de *S. cerevisiae*). Las células de *B. megaterium* y *S. cerevisiae* tienen diámetros de 1,5 µm y 6 µm, respectivamente.



David A. Stahl

Figura 11.12 Uso de tinciones filogenéticas para visualizar bacterias nitrificantes en un gránulo de fango activado de aguas residuales. (Izquierda) Micrografías de contraste de fases. (Derecha) Micrografías en color del mismo campo tras aplicar tinciones filogenéticas. La sonda que fluoresce en rojo es específica de una secuencia signatura (*véase* Tabla 11.11) del rRNA 16S de bacterias que oxidan amonio, mientras que la sonda que fluoresce en verde es específica de una secuencia presente sólo en las bacterias que oxidan nitrito. Las bacterias que oxidan amonio y las que oxidan nitrito son miembros de *Bacteria* que están estrechamente relacionadas filogenéticamente (*véanse* Secciones 12.2 y 17.12) y llevan a cabo una serie de reacciones quimiolitotróficas interdependientes (*véase* Sección 19.12).

ecológicos particulares en la naturaleza (*véanse* Figura 11.12 y Sección 18.4). En cuanto al diagnóstico clínico, FISH se ha utilizado para la identificación rápida de patógenos específicos en muestras de pacientes. FISH evita la necesidad de cultivar un organismo, permitiendo el tratamiento horas o días antes de los que se necesitarían utilizando técnicas clásicas de aislamiento e identificación.

Análisis de comunidades microbianas

La amplificación mediante PCR de los genes del RNA ribosómico no requiere la utilización de un cultivo axénico obtenido en el laboratorio. Mediante métodos que se describirán con detalle en el Capítulo 18, puede realizarse un muestreo filogenético de una población microbiana natural utilizando una PCR que amplifique los genes que codifican la subunidad pequeña del RNA ribosómico de todos los miembros de esa comunidad. Tales genes pueden ser clasificados, secuenciados y alineados, y puede generarse un árbol filogenético con estas secuencias «ambientales». El árbol revela los diferentes RNA ribosómicos presentes en la comunidad y, a partir de aquí, pueden inferirse los organismos presentes, incluso aunque ninguno de ellos pueda cultivarse en la práctica o identificado de otra manera. Tales *análisis de la comunidad microbiana*, como se han denominado, son en la actualidad un importante motor de investigación en ecología microbiana y han revelado muchas características clave de la estructura de las comunidades microbianas y de las interacciones entre sus miembros (*véase* Capítulo 18 para una explicación detallada de este tema).

✓ 11.6 Revisión de conceptos

Las secuencias signatura, cortos oligonucleótidos encontrados en una molécula de RNA ribosómico, pueden utilizarse para el diagnóstico preciso de un organismo particular o un grupo de organismos relacionados. Las secuencias signatura pueden utilizarse para generar sondas filogenéticas específicas, útiles en FISH o en análisis de comunidades microbianas.

- ✓ Utilizando los datos de secuencia de la Tabla 11.1, escoja una sonda filogenética específica que le permita distinguir una célula de *Archaea* de una de *Bacteria*.
- ✓ ¿Cómo pueden visualizarse las sondas de oligonucleótidos con un microscopio? ¿Cómo se denomina esta tecnología?

11.7 Filogenia microbiana derivada de secuencias del RNA ribosómico

Ahora consideramos lo que la secuenciación de la subunidad pequeña del RNA ribosómico ha revelado sobre la evolución microbiana. Inicialmente, los biólogos agruparon el mundo de los seres vivos en cinco reinos, de los que sólo uno era procariótico, basándose en semejanzas estructurales entre los organismos. La filogenia molecular, por el contrario, ha puesto de manifiesto que los cinco reinos no representan cinco grandes líneas evolutivas, sino que la vida celular en la Tierra ha evolucionado siguiendo sólo *tres* grandes linajes, dos de los cuales son exclusivamente microbianos y están compuestos solamente por células procarióticas. La tercera línea constituye el linaje eucariótico (Figura 11.13). Las dos líneas procarióticas son ***Bacteria*** y ***Archaea***. La línea eucariótica se denomina ***Eukarya*** (Figura 11.13). Estos términos definen los tres **dominios** de la vida, siendo el dominio el taxón biológico de más alto rango. Por tanto, las plantas (*véase* Figura 11.8), los animales, los hongos y los protistas constituyen reinos dentro del dominio *Eukarya*.

El árbol universal de la vida

El árbol filogenético universal (Figura 11.13) es como el mapa de carreteras de la vida. Describe la historia evolutiva de todos los organismos y las relaciones entre ellos y muestra claramente los tres grupos principales de organismos: los dominios filogenéticos. La *raíz* del árbol universal representa un punto en la historia evolutiva en el que toda la vida existente en la Tierra estaba representada por un antepasado común, el llamado *Antecesor Universal*.

Los proyectos de secuenciación de genomas microbianos (*véase* Capítulo 15) han proporcionado pistas acerca de la naturaleza del Antecesor Universal. Las secuencias de genomas completos han confirmado el concepto de *Archaea*, cuyos representantes contienen cientos de genes que no tienen contrapartida en *Bacteria* o *Eukarya*. Pero, los mismos proyectos de genómica han conducido al descubrimiento igualmente importante de que las especies de *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya* comparten muchos genes. ¿Cómo pueden conciliarse estos descubrimientos aparentemente contradictorios?

Una hipótesis es que en los albores de la historia de la vida, antes de que las líneas de descendencia se hubieran formado, la *transferencia génica lateral* (*horizontal*) era extensa; genes que codificaban proteínas que proporcionaban capacidades excepcionales (por ejemplo, genes para funciones celulares cruciales como la transcripción y la traducción) se transferían promiscuamente entre la población de organismos primitivos derivados de una célula ancestral común. Si la hipótesis es cierta, como han demostrado los análisis de genomas, explicaría por qué *todas las células*, sin importar el dominio al que pertenezcan, tienen muchos genes importantes en común, tal como se esperaría si todas las células compartieran un antecesor común (Figura 11.13). ¿Pero cómo explicamos las *diferencias* genéticas observadas en las secuencias completas de genomas? Una hipótesis más refinada sugiere que con el tiempo, surgieron barreras contra el flujo ilimitado de genes, quizá debido a la colonización selectiva de los hábitat (lo que generaría un aislamiento reproductivo) o como resultado de barreras estructurales o enzimáticas (por ejemplo, endonucleasas de restricción) que de algún modo impidieron el libre intercambio de genes. Como resultado, la población inicial genéticamente promiscua comenzó a separarse lentamente en las tres líneas principales de descendencia evolutiva (Figura 11.13). Mientras cada linaje continuaba evolucionando, ciertos rasgos biológicos únicos se hicieron fijos genéticamente dentro de cada grupo, de manera que lo que vemos hoy en día, después de unos 3500 millones de años de evolución microbiana, son tres dominios de vida celular que, por una parte, comparten muchas facetas comunes, mientras que por otra, muestran una historia evolutiva distintiva propia.

Organismos primitivos frente a organismos modernos

Un punto que merece una especial atención es que *ninguno* de los organismos que viven en la actualidad y aparecen en el árbol universal (Figura 11.13) es *primitivo*. Toda forma de vida existente corresponde a organismos modernos, bien adaptados a —y con éxito en— sus nichos ecológicos. Sin el menor género de duda, algunos de estos organismos pueden ser fenotípicamente similares a hipotéticos organismos primitivos y los hipertermófilos procarióticos (temperatura óptima de crecimiento >80°C) son un buen ejemplo. Por ejemplo, los organismos *Aquifex* y *Methanopyrus* se ramifican relativamente cerca de la raíz del árbol (Figura 11.13). Ambos organismos tienen capacidad de crecimiento a temperaturas muy altas (*véanse* Secciones 12.38 y 13.6), y ésta es probablemente la situación a la que tuvieron que enfrentarse los parientes primitivos de estos organismos, cuando crecían en una Tierra primitiva mucho más caliente. Del árbol filogenético se deduce que *Aquifex* y *Methanopyrus* están más cercanos a organismos primitivos que, por ejemplo, especies de Proteobacteria (*Bacteria*) o halófilos extremos (*Archaea*) (Figura 11.13), pero debe quedar claro que estos organismos de las ramas más tempranas no son primitivos. Son organismos modernos que están simplemente menos evolucionados que organismos de ramifi-

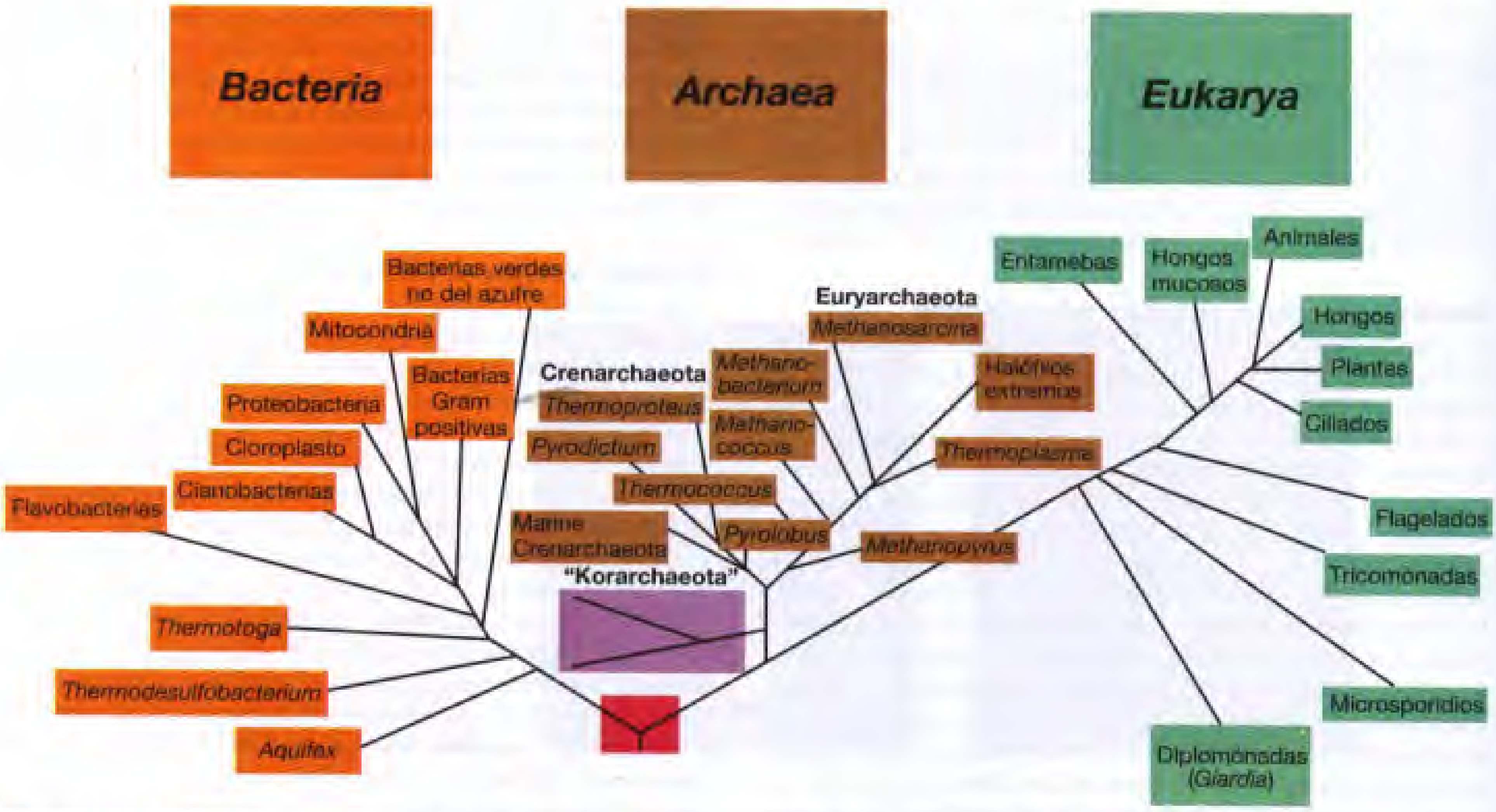

Bacteria
Archaea
Eukarya
Bacterias verdes no del azufre
Mitocondria
Bacterias Gram positivas
Proteobacteria
Cloroplasto
Cianobacterias
Flavobacterias
Thermotoga
Thermodesulfobacterium
Aquifex
Crenarchaeota
Thermoproteus
Pyrodictium
Thermococcus
Marine Crenarchaeota
Pyrolobus
"Korarchaeota"
Euryarchaeota
Methanosarcina
Methano-bacterium
Methano-coccus
Halófilos extremos
Thermoplasma
Methanopyrus
Entamebas
Hongos mucosos
Animales
Hongos
Plantas
Ciliados
Flagelados
Tricomonadas
Microsporidios
Diplomónadas (Giardia)

Figura 11.13 Árbol filogenético universal determinado por comparación de secuencias del RNA ribosómico. Dentro de cada dominio, sólo se muestran algunos organismos clave de cada linaje. Un estudio detallado de los dominios del árbol se muestra en las Figuras 12.1, 13.1 y 14.11. De los tres dominios, dos (*Bacteria* y *Archaea*) contienen sólo representantes procarióticos. La localización sombreada en rojo es la raíz hipotética del árbol y representa la posición del antecesor común de todas las células.

caciones que surgieron posteriormente en el árbol de la vida.

Bacteria

Dentro de **Bacteria**, se han descubierto al menos 40 divisiones (llamadas *phyla*; singular *phylum*, división), varias de las cuales se muestran en el árbol universal de la Figura 11.13. Muchos *phyla* están definidos exclusivamente por secuencias ambientales (*véanse* Sección 11.6 y Figura 12.1). Algunos de los linajes del dominio *Bacteria* habían sido ya identificados en función de algunas propiedades fenotípicas como su morfología o fisiología; las espiroquetas y las cianobacterias, respectivamente, son buenos ejemplos de esto. Pero la mayoría de los *phyla* contienen especies que, aunque específicamente están relacionadas desde un punto de vista filogenético, carecen de una cohesividad fenotípica fuerte. Las Proteobacterias son buenos ejemplos de ello, ya que la mezcla de fisiologías existente en el grupo casi iguala a toda la gama de fisiologías microbianas conocidas (*véase* Capítulo 17). Esto indica claramente que la fisiología y la filogenia no están necesariamente relacionadas.

Los orgánulos eucarióticos se originaron claramente a partir del dominio *Bacteria*. Como se muestra en el árbol universal, las mitocondrias surgieron de un grupo importante de *Bacteria* llamado *Proteobacteria* (Figura 11.13) y, concretamente, de «parientes» de *Agrobacterium*, *Rhizobium* y rickettsias. Resulta sorprendente que, al igual que las mitocondrias, estos últimos organismos sean también capaces de una existencia intracelular, ya sea en plantas (*véanse* Secciones 19.21 y 19.22) o animales (*véanse* Secciones 12.13/27.3). Los cloroplastos surgieron a partir del *phylum Cyanobacteria* (Figura 11.13), como sería de esperar ya que ambos llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica (*véase* Sección 17.5).

Archaea

Desde una perspectiva filogenética, el dominio **Archaea** contiene tres grandes *phyla*: Crenarchaeota, Euryarchaeota, y un posible tercer linaje llamado «Korarchaeota» (Figura 11.13). Ramificándose muy cerca de la raíz del árbol universal están los Crenarchaeota hipertermófilos como *Thermoproteus*, *Pyrolobus* y *Pyrodictium* (Figura 11.13). A éstos les siguen los Euryarchaeota, los procariotas productores de metano (metanógenos) y los halófilos extremos; *Thermoplasma*, una célula procariótica sin pared acidófila y termófila, está ligeramente relacionada con este último grupo (Figura 11.13).

Hay algunas ramas en el linaje Crenarchaeota (*véanse* Figuras 11.13 y 13.1) que se conocen a través del muestreo de genes ribosómicos de comunidades en ambientes naturales (*véase* Sección 11.6) pero no han sido obtenidos del cultivo de aislamientos reales. Sin embargo, es interesante observar que estas secuencias provienen de organismos que habitan en los océanos, como las aguas marinas antárticas cuyas temperaturas son mucho más frías que las de las fuentes termales y las corrientes hidrotermales submarinas donde habitan conocidos Crenarchaeota, así como de suelos y aguas de lagos. Comentaremos con más detalle los Crenarchaeota adaptados al frío en la Sección 13.8.

De modo similar a los Crenarchaeota adaptados al frío, todo un *phylum* de *Archaea*, el «Korarchaeota», se ha identificado gracias al análisis de comunidades microbianas (*véase* Sección 11.6), en este caso de una fuente termal específica (Obsidian Pool) en el Parque Nacional de Yellowstone (Wyoming, USA).

En el laboratorio se pueden obtener cultivos mixtos estables que contienen representantes de Korarchaeota (identificables mediante tinciones filogenéticas, *véase* Figura 11.14). A partir del medio y de las condiciones de incubación que necesitan estos cultivos, podemos deducir que los «Korarchaeota» son hipertermófilos y pueden tener propiedades similares a las de los Crenarchateoa hipertermofílicos (*véanse* Secciones 13.8-13.10). Consideraremos todo el *phylum Archaea* con más detalle en el Capítulo 13.

Eukarya

Los árboles filogenéticos de las especies del dominio **Eukarya** se generan mediante la comparación de las secuencias del rRNA 18S, el equivalente funcional del rRNA 16S presente en los ribosomas citoplasmáticos eucarióticos. Los primeros eucariotas fueron probablemente similares a los microsporidios y diplomónadas actuales. Estos organismos son parásitos estrictos que viven asociados a representantes de varios grupos de eucariotas, desde microorganismos al hombre: por ejemplo, el patógeno *Giardia* (*véase* Sección 28.7) es un miembro del grupo de los diplomonadales. Resulta interesante que, aunque contienen un núcleo rodeado por una membrana, los microsporidios y los diplomonadales carecen de mitocondrias. En este aspecto, se asemejan al tipo de célula que pudo haber aceptado por primera vez endosimbiontes estables (*véanse* Figura 11.7 y Secciones 14.5 y 14.8).

Los *Eukarya* más evolucionados filogenéticamente incluyen a seres pluricelulares (los metazoos), y culminan en los *Eukarya* más grandes y estructuralmente complejos, las plantas y los animales (Figura 11.13). Cuando el registro fó-

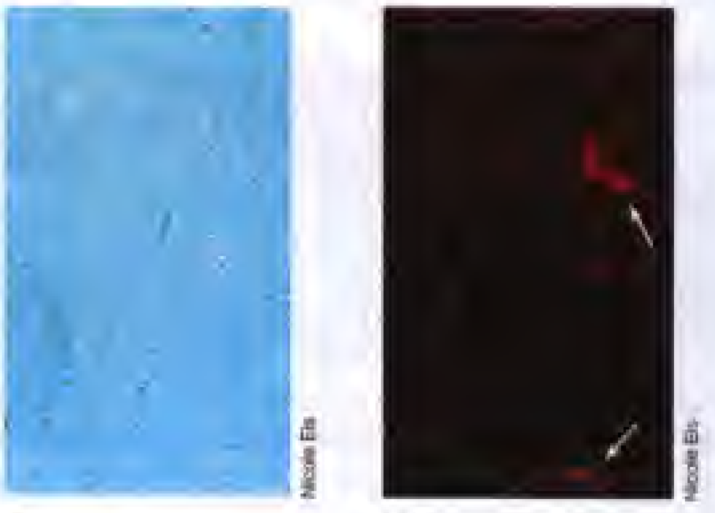


Figura 11.14 Identificación de «Korarchaeota» con tinciones filogenéticas. (a) Micrografía de contraste de fases de un cultivo de enriquecimiento que contiene células de tipo korarqueota. (b) Micrografías de fluorescencia del mismo campo pero tratado con un colorante filogenético diseñado a partir de una secuencia signatura (*véase* Sección 11.6) de un rRNA 16S de «Korarchaeota». Las dos células teñidas de rojo en este campo son korarqueotas.

sil se compara con el árbol filogenético de *Eukarya*, se observa una rápida radiación evolutiva que puede datarse hace unos 1500 millones de años. Los datos geoquímicos sugieren que éste es el periodo de la historia de la Tierra en el que se acumuló una cantidad significativa de oxígeno en la atmósfera (Figura 11.6). Por tanto, parece probable que el establecimiento de las condiciones óxicas y el desarrollo posterior del escudo de ozono (que habría aumentado considerablemente el número de hábitat adecuados para ser colonizados en la superficie) disparara también la rápida diversificación de los *Eukarya*. Consideraremos los principales grupos de los *Eukarya* microbianos y su biología básica en el Capítulo 14.

✓ 11.7 Revisión de conceptos

La vida en la Tierra evolucionó en tres líneas principales, llamadas dominios, todas ellas derivadas de un antecesor común. Cada dominio contiene varios *phyla*. Dos de los dominios, *Bacteria* y *Archaea*, permanecieron procarióticos; mientras que la tercera línea, *Eukarya*, evolucionó para convertirse en la moderna célula eucariótica.

- ✓ ¿Cómo confirma el árbol universal la idea de que la Tierra primitiva era muy caliente?
- ✓ ¿Cómo respalda el árbol universal la hipótesis de la endosimbiosis (*véase* Figura 11.7)?

11.8 Características de los dominios de la vida

Aunque los principales dominios (*Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*) se definen a partir de la comparación de las secuencias del RNA ribosómico, cada dominio se caracteriza por un conjunto de propiedades *fenotípicas*. Algunas de estas características son exclusivas de un dominio, mientras que otras se encuentran en dos de los tres dominios. Presentaremos aquí una visión general de los principales caracteres fenotípicos con valor filogenético.

Paredes celulares

Prácticamente, todas las *Bacteria* poseen paredes celulares con *peptidoglicano* (*véase* Sección 4.8). Las únicas excepciones conocidas se encuentran en los miembros del grupo *Plactomyces-Pirella* (*véase* Sección 12.29), cuyas paredes están compuestas de proteína; y en los de los grupos *Micoplasma-Chlamydia*, que carecen de paredes celulares (*véanse* Secciones 12.22 y 12.28). Por tanto, el peptidoglicano puede considerarse una molécula «signatura» de las especies de *Bacteria* (cuando se busca peptidoglicano, lo que se determina es el *ácido murámico*, que es característico y único del peptidoglicano; *véase* Tabla 11.3).

Eukarya y *Archaea* carecen de peptidoglicano. En eucariotas, si existen paredes celulares, están constituidas por celulosa o quitina (*véase* Capítulo 14). En *Archaea*, como comentamos previamente (*véase* Sección 4.8) existen varios tipos de paredes celulares, desde las que contienen pseudopeptidoglicano, análogo al peptidoglicano, a las formadas por polisacáridos, proteínas o glicoproteínas. Por tanto, se observa gran diversidad en las paredes celulares microbianas, pero es la presencia o ausencia de peptidoglicano lo que es especialmente útil para distinguir *Bacteria* de *Archaea*.

Lípidos

La naturaleza química de los lípidos de membrana es quizá el criterio no genético más útil para diferenciar *Archaea* de *Bacteria*. *Bacteria* y *Eukarya* sintetizan lípidos de membrana con un esqueleto de ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol por un enlace *éster* (*véase* Figura 11.15). Aunque la naturaleza del ácido graso puede variar ampliamente, el *enlace éster* al glicerol es la característica definitoria clave. Por el contrario, los lípidos de arqueas son moléculas con *enlaces éter* (*véase* Figura 11.15). En los lípidos esterificados, los ácidos grasos son generalmente moléculas lineales no ramificadas, mientras que en *Archaea*, están presentes carbohidratos ramificados de cadena larga, del tipo del fitanil o del bifitanil, en lugar de ácidos grasos, y están unidos al glicerol por un enlace éter.

En términos de estructura global de la membrana, las membranas de algunas *Archaea*, especialmente las especies hipertermófilas, forman una *monocapa* lipídica en lugar de una *bicapa* lipídica (*véanse* Sección 4.5 y Figura 4.20). A las temperaturas a las que crecen estos organismos, es menos probable que se desnaturalice una monocapa lipídica que una bicapa lipídica. El enlace éter entre el glicerol y las cadenas hidrofóbicas laterales (Figura 11.15) combinado con la disposición de la membrana en monocapa, protege las membranas de estas *Archaea* extremófilas de las duras condiciones de sus hábitat.

RNA polimerasa

En todos los organismos, la transcripción se lleva a cabo por medio de las RNA polimerasas dependientes de DNA; el DNA es el molde y el RNA el producto (*véase* Sección 6.7). Las células de *Bacteria* contienen un único tipo de RNA polimerasa con una estructura cuaternaria relativamente simple. Se trata de la RNA polimerasa clásica que contiene *cuatro* polipéptidos, α, β, β' y σ, combinados en una relación de 2:1:1:1, respectivamente, en la polimerasa activa (Figura 11.16) (*véase* también Sección 7.8).

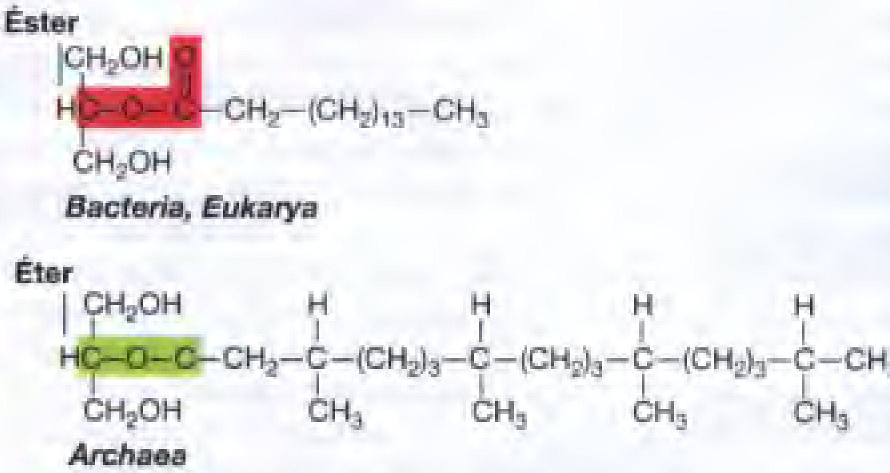


Figura 11.15 Lípidos de *Bacteria*, *Eukarya* y *Archaea*. En *Bacteria* y *Eukarya*, los lípidos contienen un ácido graso (se muestra el ácido palmítico) unido por enlaces éster al glicerol. En *Archaea*, las cadenas laterales son carbohidratos ramificados (se muestra el fitanil, C_{20}) unidos por enlaces éter al glicerol. El fitanil se sintetiza a partir del isopreno (véase Figura 4.19c).

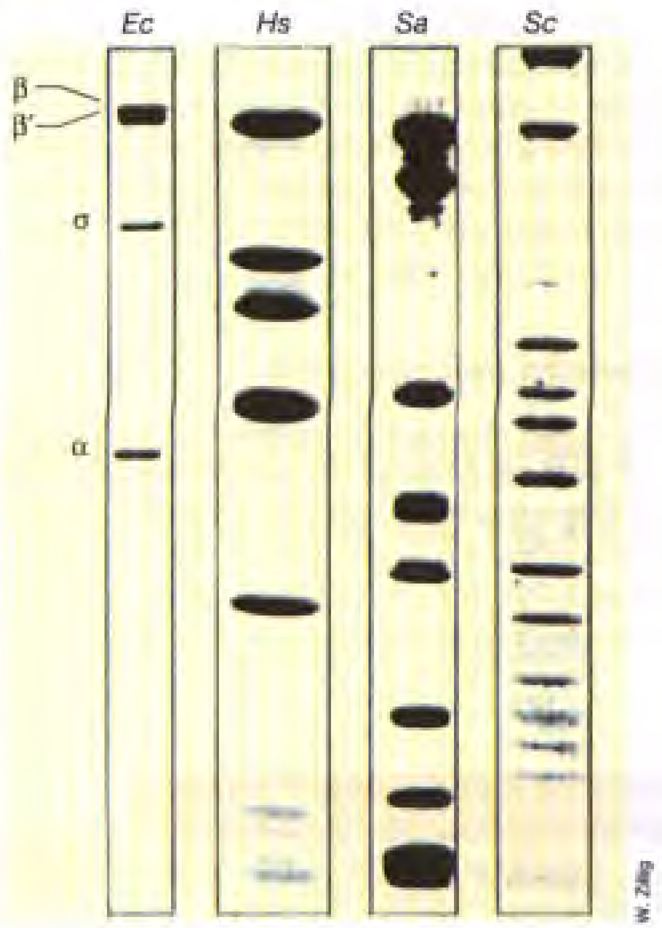


Figura 11.16 RNA polimerasas de representantes de los tres dominios: *Ec, Escherichia coli (Bacteria), Hs, Halobacterium salinarum* (Euryarcheota, *Archaea*), *Sa, Sulfolobus acidocaldarius* (Crenarcheota, *Archaea*), y *Sc, Saccharomyces cerevisiae (Eukarya)*. Los componentes purificados de las RNA polimerasas se han separado por electroforesis en un gel de poliacrilamida. Las subunidades polipeptídicas mayores están en la parte superior y las más pequeñas en la inferior. Sólo los miembros de *Bacteria* contienen la polimerasa simple (cuatro polipéptidos).

Las RNA polimerasas de *Archaea* son más complejas que las de *Bacteria*. Las RNA polimerasas de *Archaea* contienen *ocho* o más polipéptidos, lo que recuerda bastante a las de *Eukarya* (Figura 11.16). La principal RNA polimerasa de los eucariotas (hay tres) contiene 10-12 polipéptidos cuyos tamaños relativos son muy parecidos a los de las *Archaea* hipertermófilas (Figura 11.16). Así, en términos de signaturas filogenéticas, la polimerasa ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$) identifica el dominio *Bacteria*, mientras que las restantes polimerasas son demasiado complejas para tener un valor filogenético.

Características de la síntesis de proteínas

Debido a las diferencias en las secuencias del RNA ribosómico y a varios factores de la síntesis de proteínas, no es sorprendente que ciertos aspectos de la maquinaria sintetizadora de proteínas difiera en los representantes de los tres dominios. Aunque los ribosomas de *Archaea* y *Bacteria* son del mismo tamaño (70S, frente a los ribosomas 80S del citoplasma de los eucariotas), varias etapas de la síntesis de proteínas de arqueas recuerdan más a sus correlativas de eucariotas que a las de *Bacteria*. Recuérdese que la traducción siempre comienza en un codón determinado, el llamado *codón de inicio*. En *Bacteria*, este codón de inicio (AUG) codifica la incorporación de un tRNA iniciador que contiene un residuo de metionina modificado, la *formil*metionina (*véase* Sección 7.15). Por el contrario, en eucariotas y *Archaea*, el tRNA iniciador lleva una metionina *no modificada*.

La exotoxina producida por *Corynebacterium diphteriae* es un potente inhibidor de la síntesis de proteínas eucarióticas ya que ribosila ADP (añade ADP a) un factor de elongación requerido para la translocación del ribosoma a lo largo del mRNA; el factor de elongación así modificado es inactivo (*véase* Sección 21.10). La toxina diftérica también inhibe la síntesis de proteínas en *Archaea* pero no en *Bacteria*.

La mayoría de los antibióticos que afectan específicamente a la síntesis de proteínas en *Bacteria* no afectan a la síntesis de proteínas arqueana o eucariótica. La sensibilidad de representantes de los tres dominios a varios inhibidores de la síntesis de proteínas se muestra en la Tabla 11.2 (*véase* también Sección 7.15), donde varios antibióticos se han agrupado en función de sus mecanismos de acción en

TABLA 11.2 Sensibilidad de representantes de los tres dominios a varios inhibidores de la síntesis de proteínas[a]

		Archaea		*Bacteria*	*Eukarya*
Antibióticos	**Modo de acción**	Euryarchaeota *Methanobacterium thermoautotrophicum*	Crenarchaeota *Sulfolobus acidocaldarius*	*Escherichia coli*	*Saccharomyces cerevisiae*
Ácido fusídico, esparsomicina	Inhibe elongación	+	−	+	+
Anisomicina, narciclasina	Inhibe transferencia de grupo peptídico	+	−	−	+
Cicloheximida	Bloquea iniciación	−	−	−	+
Eritromicina, estreptomicina cloranfenicol	Incrementa frecuencia de errores y otros efectos	−	−	+	−
Virginiamicina, pulvomicina	Inhibe etapas de elongación	+	−	+	−
Neomicina, puromicina	Causa terminación prematura	+	+	+	+
Rifamicina	Inhibe a la subunidad β de la RNA polimerasa	−	−	+	−

[a] Un + indica inhibición de síntesis de proteínas (y de crecimiento).

la inhibición de la síntesis de proteínas en organismos de diferentes dominios.

En conjunto, estos resultados sugieren que las proteínas ribosómicas de las células de *Archaea* y *Eukarya* funcionalmente tienen más parecido entre sí de lo que cada una se asemeja a las proteínas ribosómicas del dominio *Bacteria*, y refuerzan las posiciones relativas de los tres dominios en el árbol universal (Figura 11.13).

Otras característica que definen los dominios

La investigación microbiológica ha descubierto un número de caracteres adicionales, fisiológicos y de otros tipos que pueden utilizarse para diferenciar organismos al nivel de dominio; un sumario de éstos se recoge en la Tabla 11.13. Cuando se examina esta tabla, debe tenerse en cuenta que no todos los caracteres son universales dentro de un determinado dominio. Por ejemplo, la fotosíntesis basada en la clorofila es característica de algunos representantes de *Bacteria* y *Eukarya* (y en el último caso debido a la endosimbiosis de *Bacteria* fotosintéticas). Por el contrario, otras características definitorias, tales como la presencia de peptidoglicano en las paredes celulares de *Bacteria*, pueden ser universales (o casi universales).

✓ 11.8 Revisión de conceptos

Aunque los tres dominios de los organismos vivos se definieron originalmente a partir de la secuenciación del RNA ribosómico, estudios posteriores han mostrado que difieren también en otros muchos aspectos. En particular, *Bacteria* y *Archaea* difieren ampliamente en la química de la pared celular y de los lípidos y en características de la transcripción y la síntesis de proteínas.

TABLA 11.3 Resumen de las principales características diferenciales entre *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*[a]

Característica	*Bacteria*	*Archaea*	*Eukarya*
Genética y morfológica			
Estructura celular procariótica	Sí	Sí	No
DNA covalentemente cerrado y circular	Sí	Sí	No
Histonas presentes	No	Sí	Sí
Núcleo rodeado por membrana	Ausente	Ausente	Presente
Pared celular	Ácido murámico	Ácido murámico	Ácido murámico
Lípidos de membrana	Enlaces éster	Enlaces éster	Enlaces éster
Ribosomas (masa)	70S	70S	80S
tRNA iniciador	Formilmetionina	Metionina	Metionina
Intrones en la mayoría de los genes	No	No	Sí
Operones	Sí	Sí	No
Capping y poliadenilación del mRNA	No	No	Sí
Plásmidos	Sí	Sí	Raro
Sensibilidad de ribosomas a la toxina diftérica	No	Sí	Sí
RNA polimerasas (*véase* Figura 11.16)	Una (4 subunidades)	Varias (8-12 subunidades cada una)	Tres (12-14 subunidades cada una)
Requerimiento de factores de transcripción (*véase* Sección 7.10)	No	Sí	Sí
Estructura del promotor (*véase* Sección 7.9)	Secuencias −10 y −35 (caja Pribnow)	Caja TATA	Caja TATA
Sensibilidad a cloranfenicol, estreptomicina y kanamicina	Sí	No	No
Fisiológicas			
Metanogénesis	No	Sí	No
Reducción desasimilatoria de S^0 o SO_4^{2-} a H_2S, o Fe^{3+} a Fe^{2+}	Sí	Sí	No
Nitrificación	Sí	No	No
Desnitrificación	Sí	Sí	No
Fijación de nitrógeno	Sí	Sí	No
Fotosíntesis basada en la clorophyla	Sí	No	Sí (en cloroplastos)
Metabolismo energético basado en la rodopsina	Sí	Sí	No
Quimiolitotrofia (Fe, S, H_2)	Sí	Sí	No
Vesículas de gas	Sí	Sí	No
Síntesis de gránulos de reserva de carbono compuestos de β-hidroxialcanoatos	Sí	Sí	No
Cremiento por encima de 80°C	Sí	Sí	No

[a] Nótese que para muchas de las características sólo algunos representantes de cada dominio muestran la propiedad.

✓ ¿En qué difieren los lípidos de *Bacteria* y *Eukarya* de los de *Archaea*?

✓ ¿A qué dominio de procariotas pertenecen los organismos que sintetizan RNA polimerasas que recuerdan a las de *Eukarya*? ¿Qué prueba filogenética apoya esta observación?

III TAXONOMÍA MICROBIANA Y SU RELACIÓN CON LA FILOGENIA

Una importante disciplina en microbiología es la clasificación microbiana (taxonomía). La clasificación permite a los microbiólogos establecer relaciones entre diferentes microorganismos y establecer el marco necesario para el desarrollo de una taxonomía natural (evolutiva) de estos organismos. Consideraremos las cuestiones básicas de la taxonomía bacteriana en las cuatro secciones siguientes.

11.9 Taxonomía clásica

Taxonomía es la ciencia de la clasificación y está constituida por dos subdisciplinas principales, *identificación* y *nomenclatura*. Es importante distinguir entre la *taxonomía* bacteriana y el principal tópico de este capítulo hasta ahora, la *filogenia* bacteriana, porque los términos significan en realidad cosas diferentes. Tradicionalmente, la taxonomía bacteriana se ha basado en los análisis fenotípicos —que incluyen el aspecto de un organismo, su metabolismo energético, sus enzimas, etc.— como elementos básicos de clasificación. Dado que las bacterias son tan pequeñas y contienen relativamente pocos caracteres estructurales indicativos de sus raíces evolutivas, la filogenia de los procariotas se ha empezado a conocer sólo a partir de los análisis genotípicos descritos en secciones anteriores. Sin embargo, los análisis fenotípicos (fenéticos) han tenido tradicionalmente una función importante en la identificación y clasificación bacteriana, especialmente en los campos aplicados, donde la identificación puede no ser un fin en sí misma como, por ejemplo, en el diagnóstico microbiológico clínico. En esta sección describiremos la taxonomía bacteriana clásica y en la siguiente resumiremos algunos métodos moleculares que han sido útiles en la clasificación de bacterias.

En la taxonomía bacteriana clásica, se determinan varias características y los resultados se utilizan para agrupar los organismos en la escala taxonómica, desde la especie al dominio (*véase* Tablas 11.5 y 11.6). Varios aspectos de la morfología, nutrición, fisiología y hábitat son características con valor taxonómico ampliamente utilizadas. La Tabla 11.4 divide estas categorías en tópicos específicos de valor taxonómico.

TABLA 11.4 Algunas características fenotípicas de valor taxonómico

Categoría principal	Componentes
I. Morfología	Forma, tamaño y tinción de Gram
II. Movilidad	Móvil por flagelos, móvil por deslizamiento y no móvil
III. Nutrición y fisiología	Mecanismo de conservación de la energía (fototrofo, quimiorganotrofo, quimiolitotrofo); relación con el oxígeno y temperatura; pH y requerimiento/tolerancia a sal; capacidad para usar varias fuentes de carbono, nitrógeno y azufre
IV. Otros factores	Pigmentos, inclusiones celulares o capas superficiales, patogenicidad y sensibilidad a los antibióticos

Para identificar un organismo los taxónomos clásicos aplican una serie de criterios que van desde generales a específicos. En la Figura 11.17, se muestra un ejemplo (*véase* también Tabla 11.5) donde se utilizan criterios morfológicos y fisiológicos. Usando una clave dicotómica y analizando varias características individuales de un aislamiento, la lista de posibles organismos se estrecha hasta que se realiza la identificación positiva (Figura 11.17).

La determinación del contenido en guanina más citosina en el DNA genómico de un organismo, generalmente denominado contenido en GC, puede ser una parte de la taxonomía bacteriana clásica. Esta relación de bases en el DNA se expresa como:

$$\frac{\mathrm{G} + \mathrm{C}}{\mathrm{A} + \mathrm{T} + \mathrm{G} + \mathrm{C}} \times 100\%$$

El contenido en GC puede determinarse de varias maneras, como la determinación de la temperatura de fusión (*véase* Sección 7.2), por transferencia Southern (*Southern blotting*) (*véase* Sección 10.12) o por métodos cromatográficos.

El porcentaje de GC puede variar ampliamente, con valores tan bajos como el 20% y tan altos como el 80% entre los procariotas, un rango algo más amplio que el observado en eucariotas (Figura 11.18). La composición de bases del DNA se ha determinado en una amplia variedad de organismos. El conocimiento del porcentaje de GC de un organismo es útil de vez en cuando para la identificación, pero rara vez es definitiva. Esto es debido a que dos organismos pueden tener idénticos valores GC y aún así estar poco relacionados (tanto taxonómica como filogenéticamente) ya que son posibles una gran variedad de *secuencias* para una determinada composición de bases. Así, aunque valiosos en estudios taxonómicos, los porcentajes GC generalmente tienen poco valor en la caracterización taxonómica de un organismo.

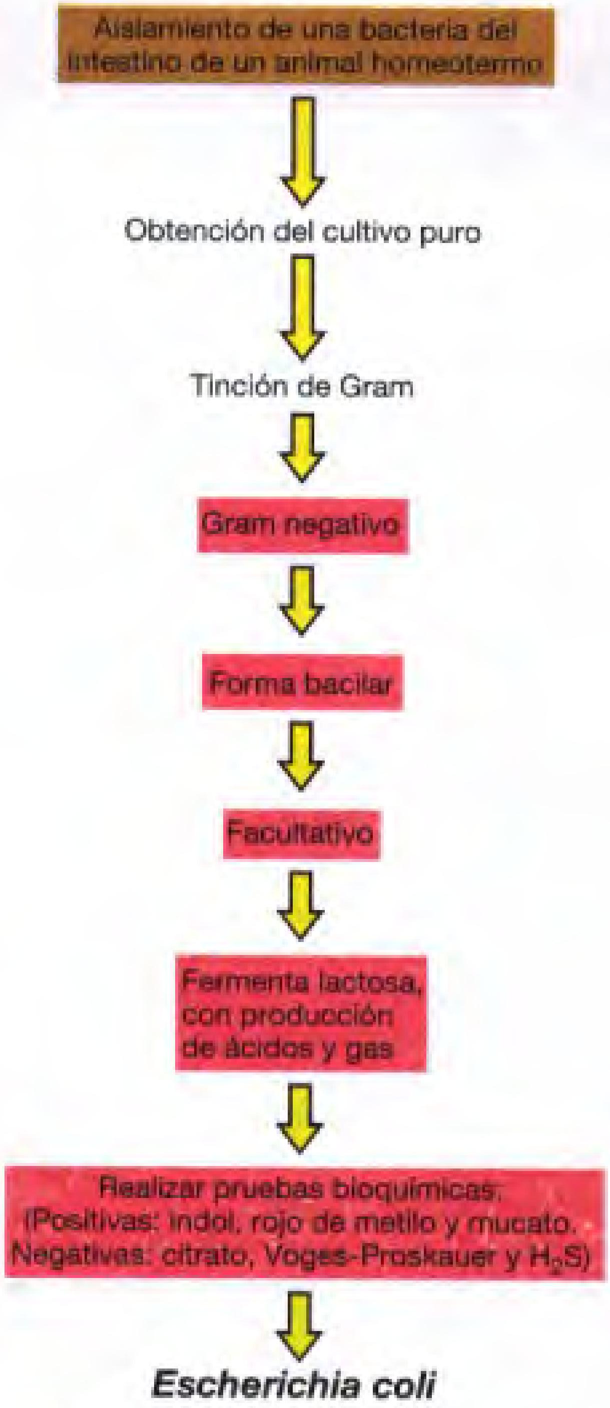

Aislamiento de una bacteria del intestino de un animal homeotermo
Obtención del cultivo puro
Tinción de Gram
Gram negativo
Forma bacilar
Facultativo
Fermenta lactosa, con producción de ácidos y gas
Realizar pruebas bioquímicas: (Positivas: indol, rojo de metilo y mucato. Negativas: citrato, Voges-Proskauer y H_2S)
Escherichia coli

Figura 11.17 Ejemplo de métodos que podrían utilizarse para identificar una nueva bacteria entérica aislada mediante técnicas microbiológicas convencionales (el ejemplo muestra los pasos a seguir para identificar *Escherichia coli*). Nótese que la mayoría de los análisis mostrados requieren que el microorganismo crezca en cultivo axénico y que en su identificación se utilizan exclusivamente criterios fenotípicos. Las pruebas bioquímicas se describen en el Capítulo 24 (*véase* Sección 24.2, Tabla 24.3 y Figura 24.7).

✓ *11.9 Revisión de conceptos*

La taxonomía bacteriana convencional concede gran importancia a los análisis descriptivos de las propiedades fenotípicas del organismo. La determinación del contenido en guanina más citosina (G + C) del DNA de los organismos puede formar parte de este proceso.

- ✓ ¿Qué propiedades fenotípicas pueden utilizarse para distinguir las bacterias?
- ✓ ¿Cómo es posible que dos organismos tengan un contenido de G + C similar en su DNA y, aún así, posean pocos genes en común?

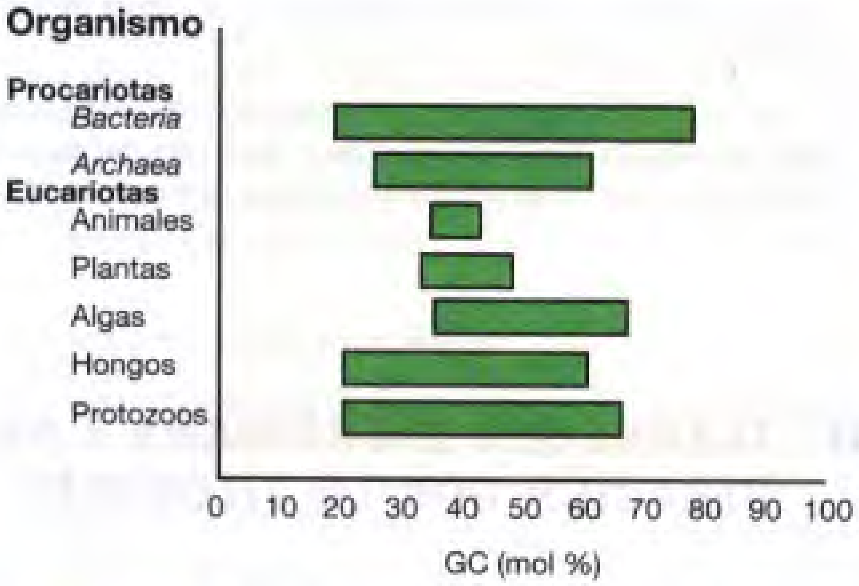


Figura 11.18 Márgenes de la composición de bases de varios organismos. Nótese que el margen más amplio corresponde a *Bacteria*.

11.10 Taxonomía molecular

La taxonomía molecular, también llamada *quimiotaxonomía*, emplea los análisis moleculares de una de las diversas biomoléculas de la célula. Entre los principales métodos quimiotaxonómicos están la *hibridación DNA:DNA*, el *ribotipado* y el *análisis de lípidos*.

Hibridación DNA:DNA

La relación de bases GC describe el porcentaje de cada nucleótido presente en el DNA genómico de una especie determinada pero no da información alguna acerca de la *secuencia* de estos nucleótidos. Las secuencias son críticas, por supuesto, ya que si dos organismos comparten muchas secuencias nucleotídicas en sus DNAs, es probable que contengan muchos genes altamente similares, si no idénticos. Cabría esperar que tales DNAs puedan hibridarse en proporción a las semejanzas en sus secuencias génicas. La hibridación genómica determina el grado de similitud de secuencias y, por tanto, es útil para diferenciar organismos estrechamente relacionados.

En la Sección 10.12, vimos la teoría y la metodología de la hibridación de ácidos nucleicos. En un experimento práctico de hibridación, el DNA aislado de un organismo se hace radiactivo con ^{32}P o ^{3}H, se corta en fragmentos relativamente pequeños, se calienta para desnaturalizarlo y se mezcla con un exceso de DNA no marcado a partir de un segundo microorganismo radiactivamente preparado de la misma manera (Figura 11.19). Luego la mezcla de DNA se enfría y se deja que vuelva a anillarse, y el DNA de doble cadena se separa de cualquier DNA residual que no haya hibridado. A continuación, se determina la cantidad de radiactividad en el DNA hibridado y se compara con el control, al cual se asigna el 100% (Figura 11.19). En los últimos años, además de la radiactividad, se han introducido una variedad de marcajes no radiactivos; éstos tienen la ventaja de que los experimentos de hibridación no generan residuos radiactivos.

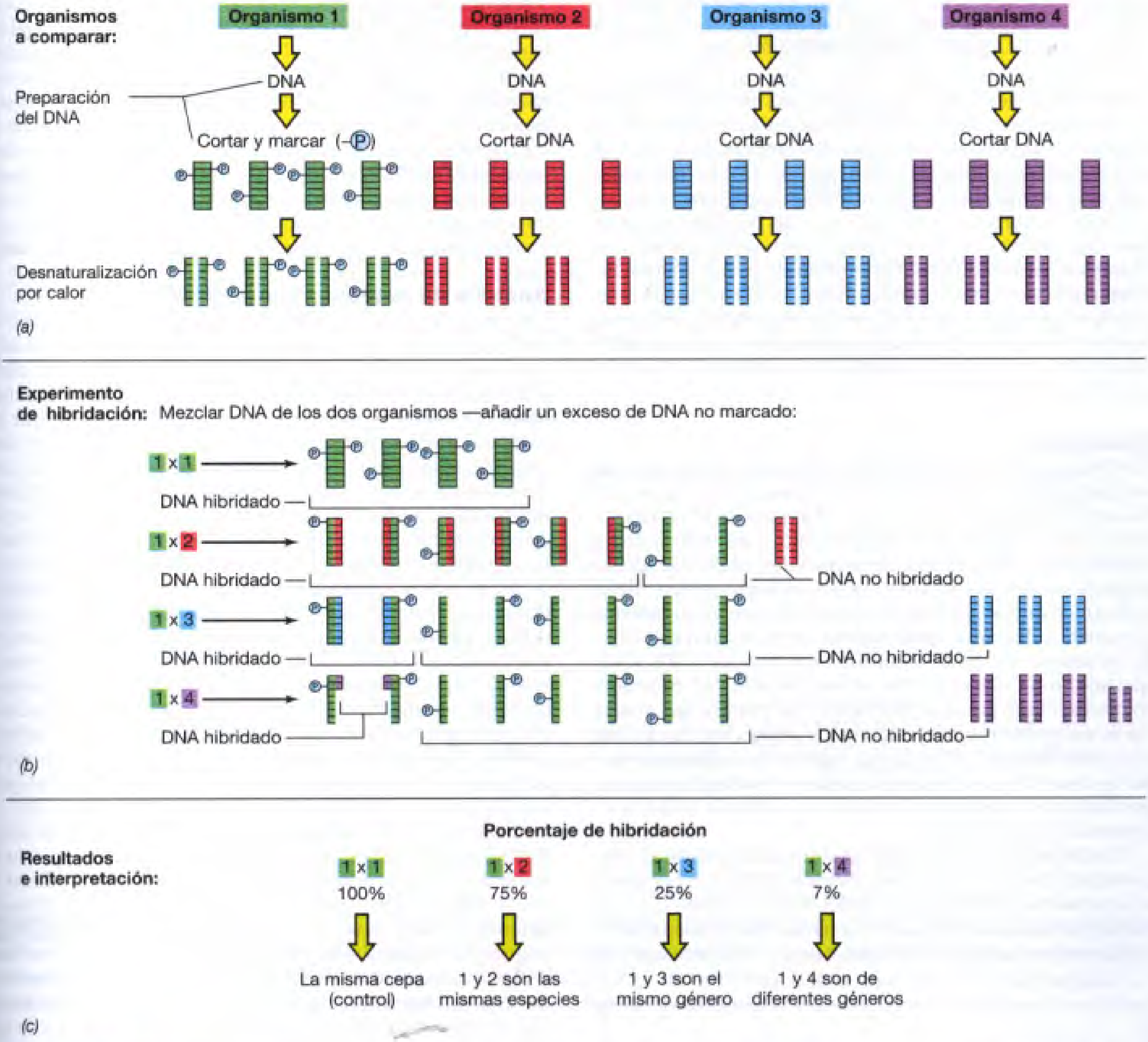

Organismos a comparar:
Organismo 1
Organismo 2
Organismo 3
Organismo 4
Preparación del DNA
DNA
Cortar y marcar (-P)
Cortar DNA
Desnaturalización por calor
(a)
Experimento de hibridación: Mezclar DNA de los dos organismos —añadir un exceso de DNA no marcado:
1 x 1
1 x 2
1 x 3
1 x 4
DNA hibridado
DNA no hibridado
(b)
Porcentaje de hibridación
Resultados e interpretación:
1 x 1 100%
1 x 2 75%
1 x 3 25%
1 x 4 7%
La misma cepa (control)
1 y 2 son las mismas especies
1 y 3 son el mismo género
1 y 4 son de diferentes géneros
(c)

Figura 11.19 La hibridación genómica como herramienta taxonómica. (a) Se aísla DNA de los organismos que se van a comparar. Uno de los DNA se marca (indicado aquí como fosfato radiactivo en el DNA del Organismo 1). (b) Experimento de hibridación. Se ensayan todas las combinaciones y se añade un exceso de DNA no marcado para evitar que el DNA marcado se reanille consigo mismo. Tras la hibridación, el DNA hibridado se separa del no hibridado antes de medir la radiactividad exclusivamente en DNA hibridado. (c) Resultados. A la radiactividad del control se le asigna un valor de hibridación del 100%.

No se ha establecido ningún acuerdo sobre el grado de hibridación entre dos DNAs necesario para asignar a dos organismos al mismo rango taxonómico. Sin embargo, se recomiendan valores de hibridación del 70% o superiores para asignar dos aislamientos a la misma especie, mientras que se requieren valores de al menos el 20-30% para encuadrar dos organismos en el mismo género (*véase* Sección 11.11 para ver las definiciones microbianas operativas de género y especie); la hibridación de los DNAs de dos organismos no relacionados produce valores menores del 10% (Figura 11.19).

La hibridación DNA:DNA es un método sensible para revelar diferencias sutiles en el esquema genético de dos organismos y es, por tanto, una técnica útil para diferenciar dos organismos estrechamente relacionados. En realidad, una aplicación común de la hibridación genómica en estudios taxonómicos es ensayar dos organismos que son sospechosos de pertenecer a especies diferentes, incluso cuando la secuenciación de la subunidad pequeña del RNA ribosómico (Figura 11.22) y los análisis fenotípicos hayan sido incapaces de revelar diferencias entre ellos.

Por supuesto, las secuencias del genoma completo convertirán en innecesarios los análisis de hibridación. Cuando se secuencia el genoma de una bacteria determinada, su conjunto completo de genes puede compararse con los de otra bacteria cualquiera (*véase* Capítulo 15). De momento, con sólo 100 genomas procarióticos completamente secuenciados, tales comparaciones no son posibles a gran escala. Sin embargo, con el tiempo, en un futuro no muy lejano los microbiólogos dispondrán de esta novísima herramienta para la taxonomía molecular. Hasta que la taxonomía se base en comparaciones de secuencias completas, la hibridación será útil en tanto que supone una estimación rápida de las similitudes genéticas y, por tanto, de las relaciones taxonómicas.

Ribotipado

El **ribotipado** es la técnica de identificación bacteriana que emplea alguno de los métodos previamente descritos para las caracterizaciones filogenéticas basadas en RNA ribosómico (*véase* Sección 11.5). Sin embargo, a diferencia de los métodos de comparación de secuencias, el ribotipado no implica secuenciación, sino que en su lugar estima el modelo único que se genera cuando el DNA de un organismo se somete a digestión con enzimas de restricción y se revela con una sonda del RNA ribosómico (Figura 11.20). Dado que las diferencias entre las secuencias del RNA ribosómico de dos organismos se traducen en la presencia o ausencia de sitios de corte para enzimas de restricción específicas, el modelo de restricción de una especie bacteriana particular es único (Figura 11.20); de hecho, el método es tan específico que ha recibido el apelativo de «huella molecular» (*molecular fingerprinting*).

En la práctica, el ribotipado comienza cuando el conjunto del DNA o el DNA que codifica el rRNA 16S y genes relacionados dentro del operón del RNA ribosómico se amplifica por PCR, se trata con una o más enzimas de restricción, se separa por electroforesis y luego se rastrea con una sonda (*véanse* Capítulos 7 y 10 para la descripción de estos métodos). El perfil generado por los fragmentos en el gel se digitaliza y se compara con perfiles de organismos relacionados presentes en la base de datos utilizando una computadora (Figura 11.20). El ribotipado no sólo es rápido (puesto que evita la secuenciación, el alineamiento de secuencias y los requerimientos analíticos de los métodos de secuenciación del RNA ribosómico), sino también un método específico de identificación bacteriana y por estas razones ha encontrado muchas aplicaciones en el diagnóstico clínico y en el análisis microbiológico de alimentos, agua y bebidas.

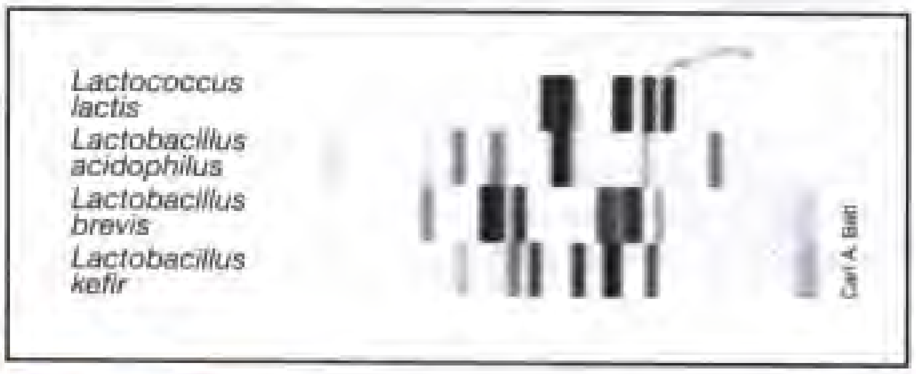


Figura 11.20 Ribotipado. Resultados del ribotipado de cuatro bacterias lácticas diferentes. El patrón de fragmentos de DNA generados por la digestión con enzimas de restricción de DNA obtenido de una colonia de cada bacteria, revelado con genes rRNA 16S utilizados como sondas, es único para cada especie e incluso para cepas de una especie. Los modelos generados en el gel por organismos conocidos se digitalizan y se guardan en una base de datos para la identificación de aislados clínicos o ambientales. Las variaciones en la posición e intensidad de las cadenas son importantes en la identificación.

Análisis de ácidos grasos: FAME

Otro método popular de identificación bacteriana consiste en la caracterización de los tipos y proporciones de los ácidos grasos presentes en los lípidos de la membrana citoplasmática y de la membrana externa de la pared celular (bacterias Gram negativas, *véase* Sección 4.9). Dado que la composición de los ácidos grasos de los procariotas es tan variable, tales como las diferencias en la longitud de las cadenas de los ácidos grasos, la presencia o ausencia de grupos insaturados, anillos o cadenas ramificadas y de grupos hidroxilos (Figura 11.21*a*), el perfil de ácidos grasos de una bacteria particular puede ser a menudo útil en el diagnóstico.

En la práctica, los ácidos grasos extraídos de hidrolizados celulares de un cultivo en condiciones estándar, se modifican químicamente para formar sus correspondientes metil ésteres. Estos derivados volátiles se identifican posteriormente por cromatografía de gases. El cromatograma con los tipos y cantidades de ácidos grasos de una bacteria desconocida se comparan con la base de datos que contiene los perfiles de ácidos grasos de miles de bacterias de referencia cultivadas en las mismas condiciones, y se selecciona el que más se parezca al de la bacteria problema (Figura 11.21*b*).

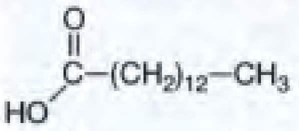
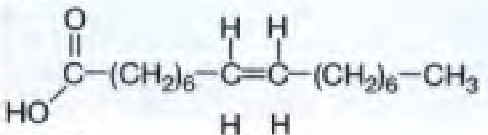
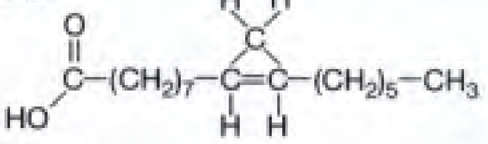
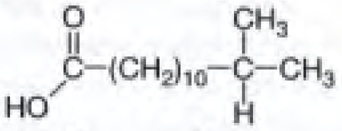
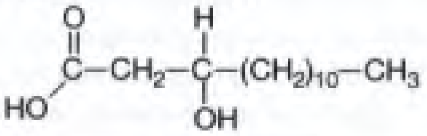
Esta técnica se ha denominado **FAME** (por *f*atty *a*cid *m*ethyl *e*ster) y es ampliamente utilizada en clínica, salud pública y en laboratorios de inspección de agua y alimentos, donde la identificación de patógenos y otras bacterias peligrosas debe realizarse rutinariamente. El análisis FAME requiere una estandarización rígida, puesto que los perfiles de ácidos grasos de un determinado organismo pueden variar con la temperatura, fase de crecimiento (fase exponencial frente a fase estacionaria) y en menor medida con la composición del medio. Así, para obtener los mejores resultados, es necesario cultivar el organismo desconocido en un medio específico y a una temperatura específica, a fin de comparar su perfil de ácidos grasos con los de los organismos de la base de datos que han sido cultivados de la misma manera.

✓ 11.10 Revisión de conceptos

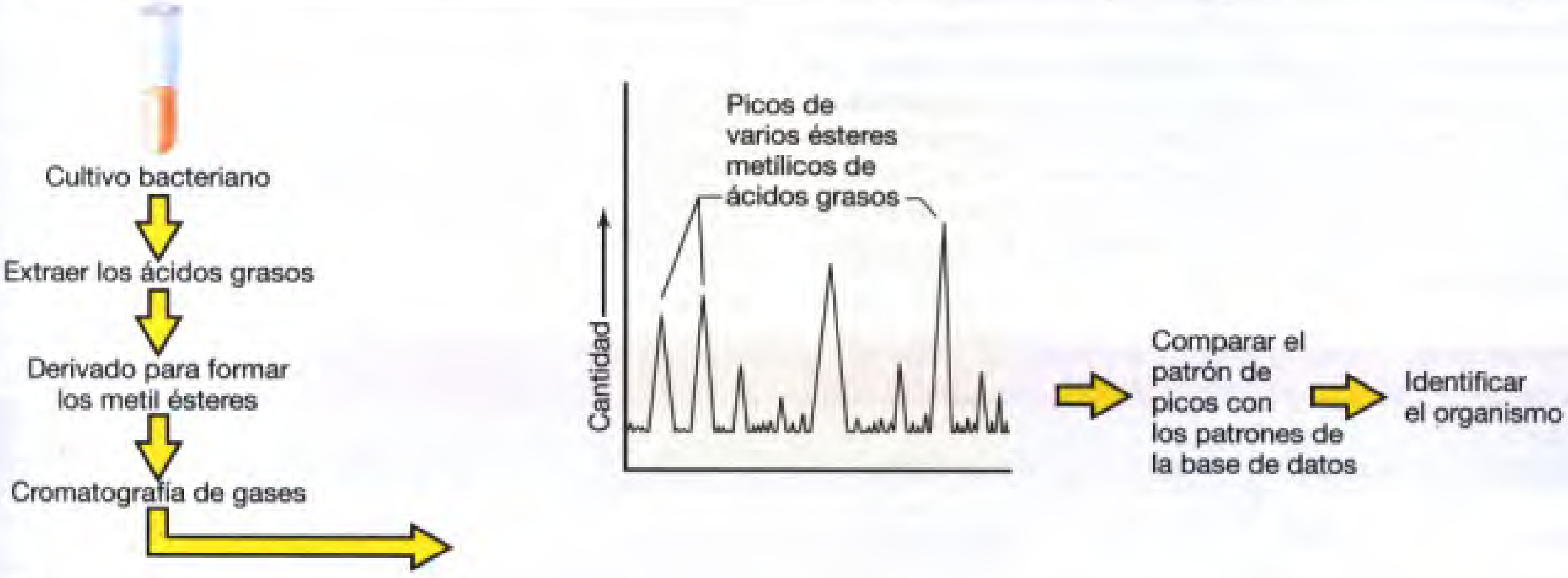
La taxonomía molecular incluye análisis moleculares de componentes celulares específicos. Éstos incluyen, entre otros, hibridación DNA:DNA, ribotipado y análisis de ácidos grasos.

- ✓ Una hibridación de menos del 10% entre el DNA de dos organismos indica que ________________.
- ✓ ¿En qué difiere el ribotipado de la secuenciación de genes del RNA ribosómico?
- ✓ ¿Qué es el análisis FAME?

Clases de Ácidos Grasos en *Bacteria*

Clase	Ejemplo	Estructura del ejemplo
Saturado	Ácido tetradecanoico	 $HO-C(=O)-(CH_2)_{12}-CH_3$
No saturado	Ácido *omega-7-cis* hexadecanoico	 $HO-C(=O)-(CH_2)_6-CH=CH-(CH_2)_6-CH_3$
Ciclopropano	Ácido *cis 7-8* metilén hexadecanoico	 $HO-C(=O)-(CH_2)_7-C(H)(CH_2)C(H)-(CH_2)_5-CH_3$
Ramificado	Ácido 13-metiltetradecanoico	 $HO-C(=O)-(CH_2)_{10}-CH(CH_3)-CH_3$
Hidroxi	Ácido 3-hidroxitetradecanoico	 $HO-C(=O)-CH_2-CH(OH)-(CH_2)_{10}-CH_3$

(a)


Cultivo bacteriano
Extraer los ácidos grasos
Derivado para formar los metil ésteres
Cromatografía de gases
Picos de varios ésteres metílicos de ácidos grasos
Cantidad
Comparar el patrón de picos con los patrones de la base de datos
Identificar el organismo

(b)

Figura 11.21 Análisis de metil ésteres de ácidos grasos (FAME) aplicado a la clasificación bacteriana. (a) Clases de ácidos grasos de *Bacteria*. Se da un único ejemplo de cada clase, pero en realidad se han descubierto más de 200 ácidos grasos diferentes en bacterias. Un metil éster contiene un grupo metilo (CH_3) en lugar de un protón en el radical carboxilo (COOH). (b) Procedimiento. Cada pico del cromatógrafo de gases se debe a un determinado métil éster de ácido graso y la altura del pico es proporcional a la cantidad.

11.11 El concepto de especie en microbiología

En el mundo de los animales y las plantas, una especie se considera como una población de individuos que puede entrecruzarse en condiciones naturales, produciendo descendencia fértil, y que está aislada reproductivamente de otras poblaciones. Sin embargo, esta definición no es aplicable a los procariotas. Los procariotas son estables y se reproducen asexualmente, de manera que conceptos tales como «producción de descendencia fértil», carecen de significado. No obstante, los microbiólogos se refieren tradicionalmente a «especies» de bacterias con la nomenclatura formal y dan nombres genéricos y específicos a los nuevos aislados bacterianos. Entonces, ¿qué es una especie bacteriana? Aunque el concepto de especie procariota está evolucionando, los microbiólogos contemporáneos han utilizado una combinación de métodos —denominada *taxonomía polifásica*— para diferenciar a las especies de procariotas en bases genéticas y fenéticas. Dentro de los criterios genéticos, la taxonomía polifásica incluye, en particular, la secuenciación de la subunidad pequeña del RNA ribosómico y la hibridación genómica.

Especies bacterianas y taxones superiores

Se ha propuesto que un procariota cuya secuencia del RNA ribosómico 16S difiera en más de un 3% de la del resto de organismos (esto es, la secuencia tiene una identidad menor del 97% con cualquier otra secuencia de la base de datos), debe considerarse una nueva especie. Esta propuesta está

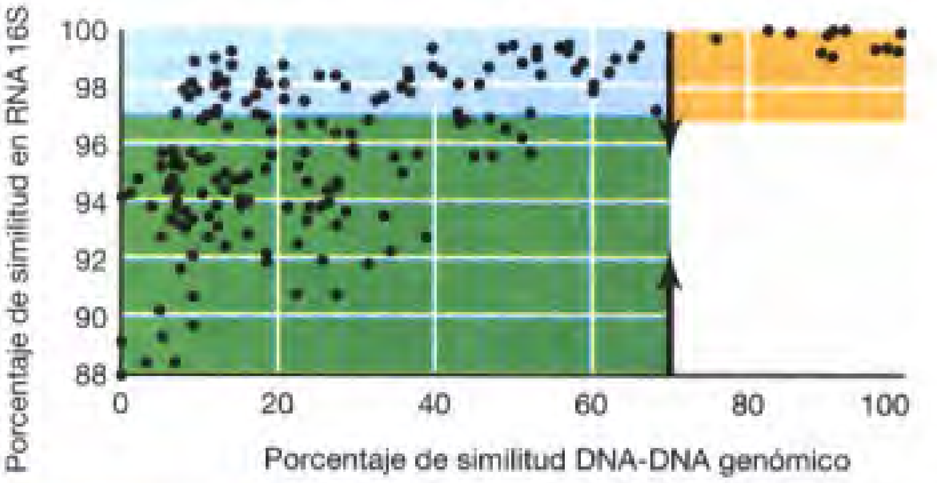
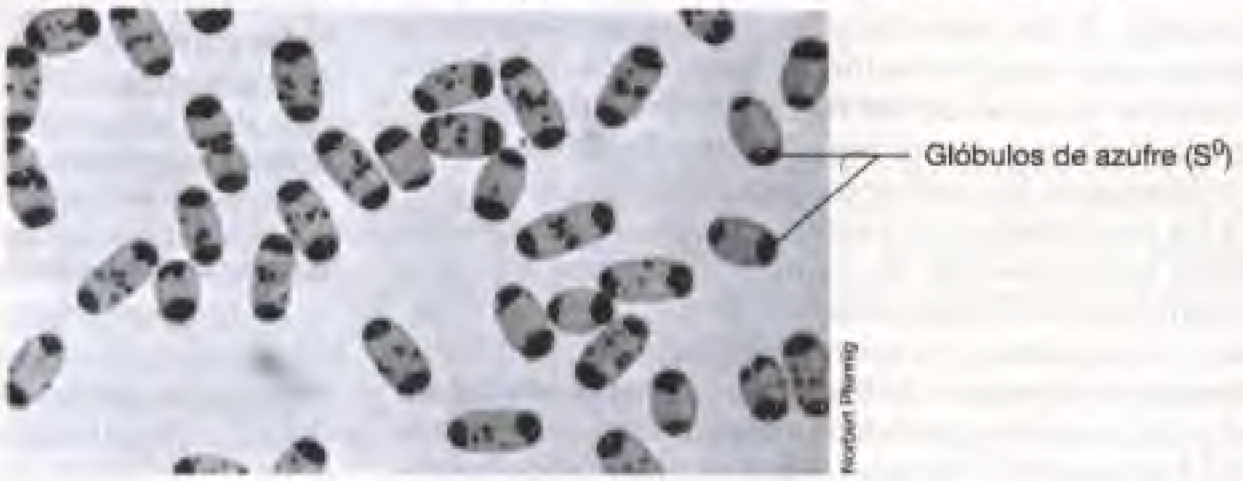


Figura 11.22 Relación entre la similitud de secuencias de RNA ribosómico 16S e hibridación de DNA de diferentes pares de organismos. Estos datos son el resultado de varios experimentos independientes con varias especies del dominio *Bacteria*. Los puntos en el recuadro naranja representan combinaciones en las que tanto la similitud de secuencia 16S como la hibridación genómica eran muy altas; por tanto, en cada caso, los dos organismos comparados pertenecían claramente a la misma especie. Por el contrario, los puntos del recuadro verde representan combinaciones que indican que los dos organismos comparados eran de diferentes especies, y ambos métodos así lo reflejan. Los puntos en el recuadro azul indican que los dos organismos comparados eran especies diferentes según la hibridación de DNA genómico, pero no según la secuenciación 16S. Nótese que por encima del 70% de hibridación, no se encontraron valores de similitud menores del 97% en el 16S. Datos procedentes de Rosselló-Mora, R. y R. Amann. 2001. *FEMS Microbiol. Revs.* 25:39–67.

sustentada por la observación de que los DNA de dos bacterias cuyas secuencias de rRNA 16S presentan una identidad menor del 97% hibridan en general menos del 70%, el valor mínimo para considerar que dos organismos pertenecen a la misma especie (*véanse* Sección 11.8 y Figura 11.19). Esto se representa en la Figura 11.22. Esta figura también muestra que la secuenciación de 16S carece del poder de resolución de la hibridación de DNA genómico para diferenciar organismos al nivel de especie. Aunque una secuencia 16S que difiere de la de todos los organismos conocidos en más del 3% es probablemente una nueva especie, tal como es definida por el criterio de menos del 70% de hibridación de DNAs, algunos organismos que tienen secuencias de los RNA ribosómicos muy similares están bastante poco relacionados (Figura 11.22). Así, una nueva especie podría perderse si se utilizara exclusivamente la secuenciación 16S como criterio taxonómico; por tanto, a nivel de especie, es necesaria una aproximación taxonómica polifásica. Por encima del rango de especie, la secuenciación 16S es una herramienta poderosa para clasificar a los procariotas. Una nueva especie se define generalmente a partir de la caracterización de varias cepas. El concepto de especie es importante en microbiología ya que confiere a las cepas selecionadas identidad taxonómica formal. Los grupos de especies se agrupan luego en **géneros**. La delimitación de un género mediante criterios moleculares es un problema de juicio, más que en el caso de la especie,

TABLA 11.5 Jerarquía taxonómica de la bacteria roja del azufre *Allochromatium warmingii*

División taxonómica	Nombre	Propiedades	Consignaturado por
Dominio	*Bacteria*	Células procarióticas y secuencias de RNA ribosómico típicas de *Bacteria*	Microscopía, secuenciación de RNA ribosómico y presencia de biomarcadores únicos, por ejemplo, el peptidoglicano
Phylum	Gamma Proteobacteria	Secuencia de RNA ribosómico típico de Proteobacteria	Secuencia de rRNA 16S
Clase	Zymobacteria	Bacterias Gram negativas	Tinción de Gram, microscopía
Orden	Chromatiales	Bacterias fototróficas púrpuras	Pigmentos característicos (*véase* Figura 17.3)
Familia	Chromatiaceae	Bacterias púrpuras del azufre	Capacidad para oxidar H_2S y almacenar S^0 dentro de la célula; observación microscópica de cultivos para detectar S^0 (*véase* fotografía)
Género	*Allochromatium*	Bacterias bacilares rojas del azufre	Microscopía (*véase* fotografía)
Especie	*warmingii*	Células de 3,5-4,0 μm × 5-11 μm; almacenan azufre principalmente en los polos de la célula (*véase* fotografía)	Medición de las células al microscopio usando un micrómetro; buscar la posición de S^0 en las células (*véase* fotografía)
Fotografía de células de *Allochromatium warmingii*:		 Norbert Pfennig	

pero diferencias de más del 5-7% (93-95% de identidad) en las secuencias 16S se han considerado como criterio para establecer un nuevo género. Los géneros se agrupan en **familias**, las familias en **órdenes**, los órdenes en **clases**, y así sucesivamente hasta el taxón de más alto nivel, el **domino** (Tablas 11.4 y 11.5). Actualmente, se reconocen más de 5200 especies de *Bacteria* y *Archaea* (Tabla 11.5).

En la identificación de un organismo desconocido es esencial que el organismo satisfaga todos los criterios taxonómicos de los niveles *superiores* al de especie. Así, en el ejemplo dado en la Tabla 11.4 donde se muestra la jerarquía taxonómica de la bacteria *Allochromatium warmingii*, todas las especies del género *Allochromatium* deben ser *Bacteria* Gram negativas de forma bacilar, púrpuras del azufre; si no se cumple alguno de estos criterios, el organismo no se considerará una especie de *Allochromatium*. En otras palabras, cuando uno desciende del nivel de dominio al de especie a través de la jerarquía taxonómica, los criterios utilizados para distinguir dos organismos se hacen menos generales y más específicos (Tabla 11.4).

Especiación bacteriana

¿Cómo surge una nueva especie bacteriana? Imaginemos una población de células que se ha originado a partir de una única célula y que ocupa un nicho ecológico particular. Si las células de una población comparten un recurso (nutriente o medio) determinado (por ejemplo, un nutriente clave), esta población de células puede denominarse un *ecotipo*. En un hábitat pueden existir diferentes ecotipos, pero cada uno tiene éxito sólo dentro de su nicho en el hábitat. Dentro de un ecotipo dado, la aparición de una mutación adaptativa va seguida de la selección periódica, sustituyéndose el viejo ecotipo por una población del nuevo ecotipo (Figura 11.23). De esta manera, las poblaciones de células divergen finalmente entre sí, y repetidos ciclos de mutación y selección terminan por originar un ecotipo que es lo suficientemente distinto desde el punto de vista genético para ser reconocido como una nueva especie (Figura 11.23). Esta serie de acontecimientos dentro de un ecotipo no tienen efecto en otros ecotipos, puesto que no compiten por los mismos recursos (Figura 11.23).

La especiación bacteriana se ve también afectada por la transmisión lateral (horizontal) de genes, la transferencia de genes entre especies por conjugación, transducción y transformación (*véase* Capítulo 10). Los procariotas son sexualmente promiscuos y pueden intercambiar genes a través de amplias barreras filogenéticas. Por tanto, una nueva capacidad genética dentro de un ecotipo puede provenir de genes obtenidos de células de otro ecotipo más que mediante mutación y selección. Aun así, la especiación actual se cree que es más un resultado de la mutación y selección periódica de los genes del genoma propio que de la adquisición de genes por transferencia lateral. A diferencia del conjunto de genes de un organismo, los genes adquiridos por transferencia lateral son generalmente escasos en número, confieren sólo un beneficio temporal en el nicho del organismo, y, con frecuencia, se pierden fácilmente si la presión selectiva para retenerlos disminuye.

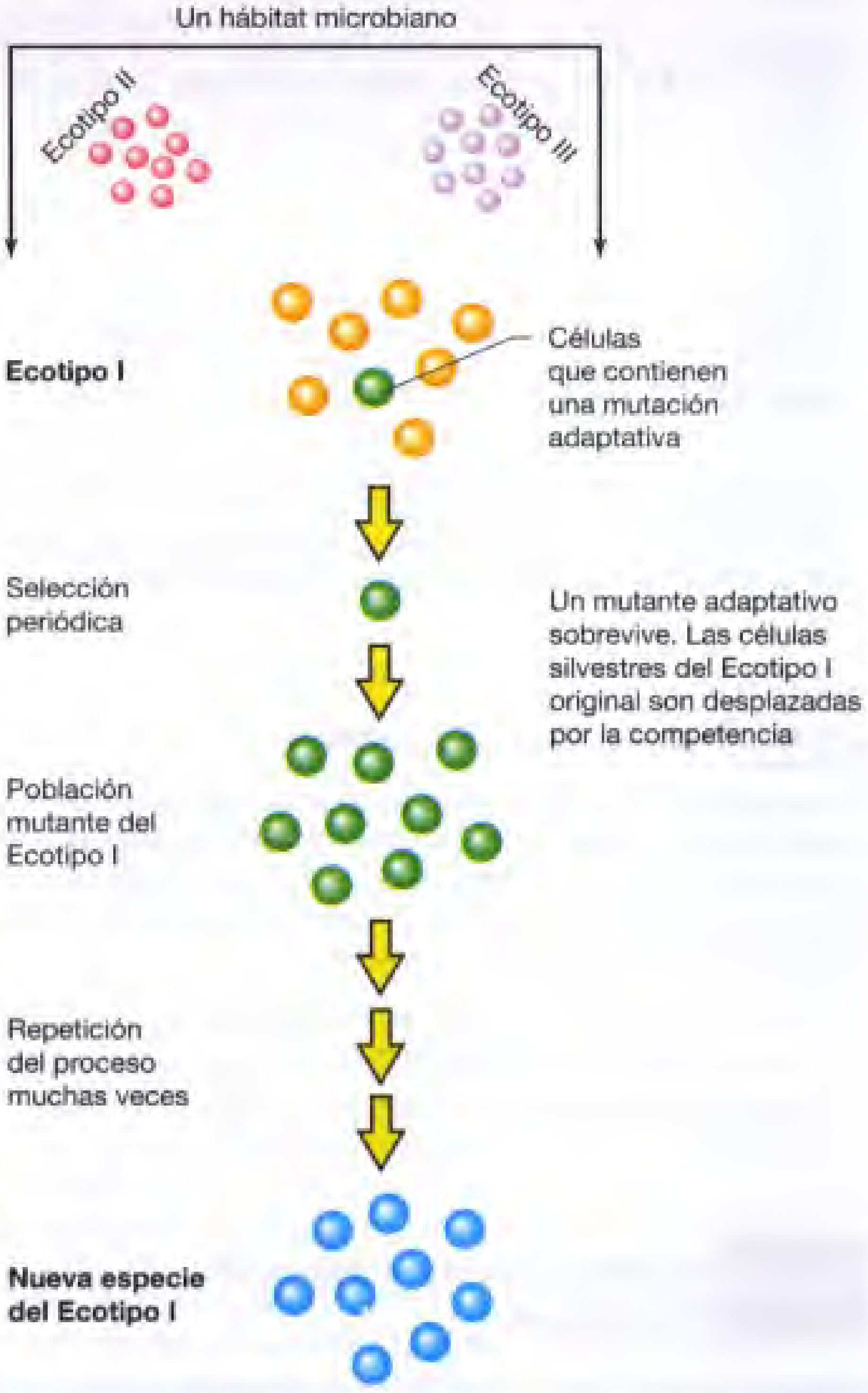

Un hábitat microbiano
Ecotipo II
Ecotipo III
Ecotipo I
Células que contienen una mutación adaptativa
Selección periódica
Un mutante adaptativo sobrevive. Las células silvestres del Ecotipo I original son desplazadas por la competencia
Población mutante del Ecotipo I
Repetición del proceso muchas veces
Nueva especie del Ecotipo I

Figura 11.23 Posible mecanismo de especiación bacteriana. Varios ecotipos pueden coexistir en un único hábitat microbiano, ocupando cada uno su propio nicho ecológico primario. Cuando se produce una mutación beneficiosa dentro de un ecotipo, la célula que contiene la mutación adaptativa formará finalmente una población que reemplazará al ecotipo original. Al producirse este proceso repetidamente dentro de un determinado ecotipo, se forma una población de células genéticamente distintas que representa una nueva especie. Puesto que otros ecotipos no compiten por los mismos recursos, no verán afectados por los sucesos genéticos y selectivos que tienen lugar fuera de su ecotipo.

El resultado neto de casi 4000 millones de años de evolución bacteriana (*véase* Figura 11.6) son las especies bacterianas que vemos hoy. Los microbiólogos coinciden en que no se tiene una idea clara de cuántas especies de procariotas existen. Se conocen varios miles (Tabla 11.6), y se sospecha la existencia de varios miles más, quizá un total de 100 000-200 000 (o más, según algunas estimaciones). En cualquier caso, la amplitud de la diversidad procariótica es enorme.

TABLA 11.6 Niveles taxonómicos y número de especies procarióticas conocidos[a]

Nivel	*Bacteria*	*Archaea*	Total
Dominios	1	1	2
Phyla	23	3[a]	26
Clases	32	8	40
Órdenes	77	12	89
Familias	182	21	203
Géneros	871	69	941
Especies	5007	217	5224

[a] Los números se refieren a los nombres de géneros y especies de *Bacteria* y *Archaea* oficialmente reconocidos en el año 2001.

Fuente: Garrity, G. M., Boone, D. R. y R.W. Castenholz (eds.). 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Vol. 1. Springer, New York.

✓ 11.11 Revisión de conceptos

El concepto de especie se aplica tanto a los procariotas como a los eucariotas, existiendo una jerarquía taxonómica similar, siendo el dominio el taxón de más alto nivel. La especiación bacteriana puede producirse debido a la selección periódica de un carácter favorable dentro de un ecotipo.

✓ Si un género determinado incluye varias ________, un ________ incluye varios géneros.

✓ ¿Qué es un ecotipo?

11.12 Nomenclatura y *Manual de Bergey*

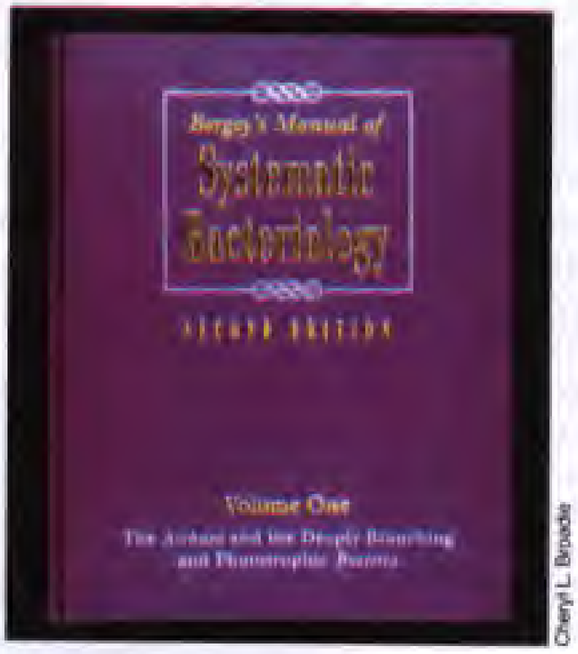
Siguiendo el sistema binomial de nomenclatura usado en biología, las bacterias reciben un nombre para el género y un nombre para la especie. En general, los nombres derivan del latín o griego latinizado que describen alguna propiedad típica de la especie y se escriben en letras itálicas o cursivas. Por ejemplo, se han descrito más de 100 especies diferentes del género *Bacillus*, tales como *Bacillus* (*B.*) *subtilis*, *B. cereus*, *B. tearothermophilus* y *B. acidocaldarius*. Estos nombres específicos significan «fino», «ceroso», «amante del calor» y «ácido-termal», respectivamente, y en general describen las características morfológicas, fisiológicas o ecológicas importantes de cada organismo.

Colecciones de cultivos tipo y publicación de nuevos taxones

Cuando se aísla un organismo nuevo y se cree que es único, debe tomarse la decisión de si es suficientemente diferente de otras especies como para ser descrito como nuevo, o quizá, incluso lo suficientemente diferente de todos los géneros descritos para merecer ser definido como un nuevo género (en este caso la especie queda automáticamente creada). Para realizar la propuesta taxonómica formal, como la creación de nuevo género o especie, se publica una descripción detallada del aislado y del nombre propuesto y se deposita un cultivo viable del organismo en dos colecciones de cultivos, tales como la americana y alemana: *American Type Culture Collection* (ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo; Manasas, Virginia, USA) y *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zelkulturen* (DSMZ, Colección Alemana de Microorganismos; Braunschweig, Alemania) (*véase* Sección 30.1). La cepa depositada sirve como cepa *tipo* de la nueva especie y como estándar para comparar otras cepas que se crea que puedan ser la misma.

Las colecciones de cultivo conservan el cultivo depositado, generalmente congelándolo a temperaturas bajas (de −80°C a −196°C) o liofilizándolo. Esta práctica difiere de las utilizadas en botánica o zoología. Estas disciplinas utilizan especímenes preservados (muertos, bien como material de herbario seco o animales fijados químicamente) como el modelo al que comparar las nuevas especies que se proponen. Los microbiólogos confían en una cepa tipo viva que pueda ser distribuida entre la comunidad científica, cultivada y estudiada; esta práctica permite comparaciones más detalladas y reproducibles, especialmente a nivel molecular.

Si la descripción de un nuevo organismo se publica en una revista diferente al *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (*IJSEM*), publicación oficial de los registros de taxonomía y clasificación de procariotas y levaduras, debe enviarse a esta revista una separata del trabajo publicado y el nombre validado, antes de que sea aceptado formalmente como un nuevo taxón microbiológico. En cada número, el IJSEM publica una lista de nombres aprobados para su inclusión en el *Manual de Bergey de bacteriología sistemática* (Figura 11.24), un importante tratado de la taxonomía de procariotas.



Cheryl L. Broadie

Figura 11.24 *Manual de Bergey de bacteriología sistemática*, segunda edición. Esta fuente describe, en cinco volúmenes, las principales propiedades de todos los procariotas, tanto *Bacteria* como *Archaea*.

El *Manual de Bergey* y *Los procariotas*

Aunque no existe una fuente *oficialmente* reconocida en el campo de la taxonomía microbiana, el *Manual de Bergey de bacteriología sistemática* (*Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology*) es la referencia más indicada. Ampliamente usado, el *Bergey's Manual* (*Manual de Bergey*) (Figura 11.24) es un compendio de información estándar y molecular de todas las especies reconocidas de procariotas en el momento de su publicación y contiene un buen número de tablas, figuras y otra información sistemática útil a efectos de identificación. La segunda edición del *Manual de Bergey*, publicado en cinco volúmenes que aparecerán a lo largo de varios años a partir del 2001, ha incorporado muchos de los conceptos surgidos de los estudios de secuenciación del RNA ribosómico y los mezcla con una abundante información de la taxonomía clásica. Una segunda referencia importante es un tratado de muchos volúmenes llamado *The Prokaryotes* (*Los procariotas*). Este tratado, con más de 4100 páginas en su segunda edición (1992), es ahora accesible en su edición *online* (http://www.prokaryotes.com) que se revisará periódicamente para reflejar en ella el rápido ritmo al que se genera nueva información sobre la taxonomía y filogenia procariótica. Colectivamente, el *Manual de Bergey* y *Los procariotas* ofrecen a los microbiólogos los fundamentos de la taxonomía y filogenia microbiana tal como la conocemos hoy, y son las primeras fuentes que los taxónomos consultan cuando caracterizan un nuevo aislamiento de un procariota.

✓ 11.12 Revisión de conceptos

Los procariotas reciben nombres para el género y epítetos para la especie descriptivos. El reconocimiento formal de una nueva especie procariótica requiere depositar una muestra del organismo en un centro de colección de cultivos y la publicación oficial, así como la descripción, de la nueva especie. El *Bergey ´s Manual of Systematic Bacteriology* es una recopilación de *Bacteria* y *Archaea*.

- ✓ ¿Qué es el IJSEM y qué función taxonómica representa?
- ✓ ¿Por qué el material celular vivo puede ser más útil en taxonomía que los organismos preservados?

Preguntas de repaso

1. ¿Cuál es la edad del planeta Tierra? ¿Cuál es la edad de los primeros microfósiles conocidos?
2. ¿Cuáles son las principales características que debieron haber tenido los organismos primitivos para poder multiplicarse y por qué?
3. Explique la función que los compuestos de hierro-azufre y el H_2 pudieron haber desempeñado en los procesos iniciales de la vida.
4. ¿Por qué la evolución de las cianobacterias fue tan importante para la evolución posterior de la vida en la Tierra?
5. ¿Qué propiedades del RNA habrían hecho posible una era de vida con RNA? Si las formas de vida con RNA existieron alguna vez, ¿por qué no existe rastro de ellas en la actualidad?
6. ¿Cuáles podrían ser las ventajas de abandonar la era de la vida con RNA, en favor de una vida celular basada en DNA, RNA y proteína?
7. ¿Por qué los RNA ribosómicos son mejores moléculas para los estudios filogenéticos que las proteínas del tipo ferredoxina, citocromos o enzimas específicas?
8. ¿Qué son las secuencias signatura y cuál es su valor filogenético? ¿Cómo se reconocen las secuencias signatura?
9. ¿Qué es la tecnología FISH? Describa con un ejemplo cómo la usaría.
10. Describa los métodos implicados en la obtención de secuencias de rRNA 16S. ¿Qué función tiene la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la filogenia molecular?
11. ¿En qué consiste *el muestreo de una comunidad microbiana* y qué información puede darnos este método sobre la diversidad microbiana en un determinado hábitat?
12. ¿Qué hallazgo filogenético importante derivó del estudio de las secuencias del RNA ribosómico? ¿Cómo modificó el punto de vista clásico de la evolución? ¿Cómo respalda este descubrimiento las ideas previas acerca del origen de los organismos eucarióticos?
13. ¿Qué importantes propiedades fisiológicas y bioquímicas comparte *Archaea* con *Eukarya*? ¿Y con *Bacteria*?
14. ¿Cuáles son las principales características fenotípicas usadas por la taxonomía bacteriana clásica para agrupar los organismos? ¿Cuáles, si es que alguna, de estas propiedades tienen valor filogenético predictivo?
15. ¿Por qué los porcentajes de bases GC no son útiles para hacer determinaciones filogenéticas? ¿En qué situaciones este porcentaje es de utilidad en estudios taxonómicos?
16. ¿En qué difiere el ribotipado de la secuenciación 16S en cuanto herramienta para la identificación de microorganismos?
17. ¿Qué se determina en el análisis FAME?
18. Examine el siguiente nombre bacteriano: *Pseudomonas aeruginosa*. ¿Qué parte corresponde al epíteto de *especie*? ¿Cuál es el otro nombre? Con respecto a la jerarquía taxonómica, ¿cuál de los dos nombres podría tener otros nombres por *debajo* de él?
19. ¿Cómo se cree que surge una nueva especie bacteriana?

Ejercicios prácticos

1. Compare y diferencie las condiciones físicas de la Tierra en el momento en el que apareció la vida por vez primera con las condiciones de la actualidad. Desde un punto de vista fisiológico, explique al menos dos de las razones por las que los *animales* no pudieron haber existido en la Tierra primitiva.
2. ¿Por qué es altamente improbable que la vida pudiera originarse en la actualidad como lo hizo hace miles de millones de años?
3. Imagine que está debatiendo con alguien contrario a la teoría de la endosimbiosis. Cite cinco pruebas que utilizaría para convencer a su oponente de que la endosimbiosis tuvo lugar. (Tal vez desee revisar el Capítulo 14 antes de escribir su respuesta.)
4. Basándose en las siguientes secuencias, calcule la distancia evolutiva entre estos tres organismos y prediga cuáles son las dos más cercanas entre sí.

   Organismo 1: AGGUACGUUA
   Organismo 2: UGCCACGGUU
   Organismo 3: AGGUACGGUA

   Dibuje un árbol filogenético que muestre las relaciones evolutivas aproximadas de estos tres organismos.
5. Imagine que está haciendo el análisis de los lípidos de dos procariotas según se muestra en la Figura 11.21. Los resultados obtenidos para el cultivo A muestran que hay abundancia de ácidos grasos insaturados de cadena corta. Los análisis de las células del cultivo B dan como resultado la presencia de lípidos fitanilo unidos por enlaces éter. Basándose en esta información, ¿a qué dominios filogenéticos pertenecen los organismos A y B? Si se le dijera que ambos tipos de organismos son extremófilos (*véase* Sección 2.4), y que uno proviene de una fuente termal y otro del hielo del océano polar, ¿cuál sería cada uno de ellos? Por último, en función de su análisis de los lípidos y su conocimiento a cerca de dónde se localizan mayoritariamente los lípidos en la célula (*véanse* Sección 3.4 y Figura 3.3), describa cómo las sustancias detectadas los benefician o ayudan en sus ambientes extremos. (Quizá necesite revisar la información dada en las Secciones 6.8-6.10 antes de contestar.)
6. Determine el porcentaje GC del siguiente fragmento de DNA:

   TAAGCCTGCAAGCTTAGCTA
   ATTCGGACGTTCGAATCGAT
7. ¿Qué fuentes bibliográficas consultaría para obtener información de la taxonomía y filogenia de los procariotas? Si su biblioteca tiene ambas informaciones, compare sus tablas y contenidos. ¿Cuál de ellas pone mayor énfasis en la clasificación y la nomenclatura? ¿Y en el enriquecimiento, aislamiento y cultivo?

M El árbol filogenético de *Bacteria* contiene alrededor de 20 phyla de representantes cultivables y otros 20-30 phyla que se sabe que existen pero aún no cultivados. Las especies de *Bacteria* muestran una gran diversidad en términos de morfología, fisiología e historia evolutiva. La bacteria gigante del azufre *Achromatium*, mostrada aquí, es un género de quimiolitotrofos, aquellos procariotas que utilizan los compuestos *inorgánicos* como donadores de electrones para el metabolismo y obtención de energía. Algunos tipos fisiológicos de quimiolitotrofos, muchos quimioorganotrofos y uno de los principales grupos de fototrofos (bacterias rojas) se encuentran distribuidos entre varios subgrupos de Proteobacteria, el mayor phylum de *Bacteria*.

12

LA DIVERSIDAD PROCARIÓTICA: *BACTERIA*

I FILOGENIA BACTERIANA 353
12.1 Generalidades de la filogenia de *Bacteria* 353
II PHYLUM 1: PROTEOBACTERIA 354
12.2 *Bacteria* rojas fototróficas 354
12.3 *Bacteria* nitrificantes 359
12.4 *Bacteria* oxidantes del azufre y del hierro 360
12.5 *Bacteria* oxidantes del hidrógeno 363
12.6 Metanotrofos y metilotrofos 365
12.7 *Pseudomonas* y grupo de las pseudomonas 368
12.8 *Bacteria* del ácido acético 371
12.9 *Bacteria* aeróbicas de vida libre fijadoras de nitrógeno 372
12.10 *Neisseria*, *Chromobacterium* y géneros relacionados 374
12.11 *Bacteria* entéricas 375
12.12 *Vibrio* y *Photobacterium* 379
12.13 Ricketsias 381
12.14 Espirilos 383
12.15 Proteobacterias con vaina: *Sphaerotilus* y *Leptothrix* 386
12.16 *Bacteria* pedunculadas/con prostecas y que geman 388
12.17 Mixobacterias deslizantes 392
12.18 Proteobacterias reductoras del sulfato y del azufre 395
III PHYLUM 2: *BACTERIA* GRAM POSITIVAS 398
12.19 *Bacteria* Gram positivas no esporuladas, con bajo contenido en GC: Bacteria del ácido láctico y géneros relacionados 398
12.20 *Bacteria* Gram positivas esporuladas, con bajo contenido en GC: *Bacillus*, *Clostridium* y géneros relacionados 403
12.21 *Bacteria* Gram positivas sin pared celular con bajo contenido en GC: los micoplasmas 408

12.22 *Bacteria* Gram positivas con alto contenido en GC: corineformes y *Bacteria* del ácido propiónico 410
12.23 *Bacteria* Gram positivas con alto contenido en GC: *Mycobacterium* 412
12.24 *Bacteria* Gram positivas, filamentosas, con alto contenido en GC: *Streptomyces* y otros actinomicetos 414
IV PHYLUM 3: CIANOBACTERIAS Y PROCLOROFITOS 418
12.25 Cianobacterias 418
12.26 Proclorofitos y cloroplastos 422
V PHYLUM 4: CLAMIDIAS 423
12.27 Clamidias 423
VI PHYLUM 5: *PLANCTOMICES/PIRELULA* 425
12.28 *Planctomyces*: una bacteria pedunculada filogenéticamente única 425
VII PHYLUM 6: VERRUCOMICROBIOS 426
12.29 *Verrucomicrobium* y *Prosthecobacter* 426
VIII PHYLUM 7: FLAVOBACTERIAS 427
12.30 *Bacteroides* y *Flavobacterium* 427
IX PHYLUM 8: GRUPO CITOFAGA 428
12.31 *Cytophaga* y géneros relacionados 428
X PHYLUM 9: *BACTERIA* VERDES DEL AZUFRE 428
12.32 *Chlorobium* y otras *Bacteria* verdes del azufre 428
XI PHYLUM 10: ESPIROQUETAS 432
12.33 Espiroquetas 432
XII PHYLUM 11: DEINOCOCOS 435
12.34 *Deinococcus/Thermus* 435
XIII PHYLUM 12: *BACTERIA* VERDES NO DEL AZUFRE 436
12.35 *Chloroflexus/Heliothrix* 436
XIV PHYLA 13 Y 14: *BACTERIA* HIPERTERMÓFILAS MUY RAMIFICADAS 437
12.36 *Thermotoga* y *Thermodesulfobacterium* 437
12.37 *Aquifex*, *Thermocrinus* y géneros relacionados 438
XV PHYLA 15 Y 16: *NITROSPIRA* Y *DEFFERIBACTER* 439
12.38 *Nitrospira*, *Defferibacter* y géneros relacionados 439

Glosario

Ácido alcohol resistencia una propiedad de las especies del género Mycobacterium donde las células teñidas con el colorante básico fuchsina, resisten la decoloración con alcohol acidificado

Bacterias entéricas un gran grupo de bacilos Gram negativos y metabolismo anaerobio facultativo

Bacterias nitrificantes quimiolitotrofos capaces de llevar a cabo la transformación $NH_3 \rightarrow NO_2$ o $NO_2 \rightarrow NO_3$

Bacterias reductoras de sulfato un gran grupo de bacterias anaerobias que respiran anaeróbicamente utilizando SO_4^{2-} como aceptor de electrones produciendo H_2S

Bacterias rojas del azufre un grupo de procariotas fototrópico que contienen bacterioclorofila *a* o *b*, que se caracterizan por su capacidad de oxidar H_2S y por acumular azufre elemental en el interior celular (excepto en el género *Ectothiorhodospira* que lo hace en el exterior)

Bacterias rojas no del azufre un grupo de procariotas fototrópicos que contienen bacterioclorofila *a* o *b* que crecen mejor como fotoheterotrofos y tienen relativamente baja tolerancia a H_2S

Bacterias verdes procariotas fototróficos anoxigénicos que contienen clorosomas y bacterioclorofilas *c*, *d* o *e*

Carboxisomas inclusiones celulares cristalinas y poliédricas de ribulosa difosfato carboxilasa (RubisCO), enzima clave del ciclo de Calvin

Cianobacteria procariotas fotosintéticos oxigénicos que contienen clorofila *a* y ficobilinas pero no clorofila *b*

Clorosomas estructuras en forma de cigarro rodeados por membrana atípica y que contienen los pigmentos fotosintéticos bacterioclorofilas *c*, *d* o *e* en bacterias verdes y *Chloroflexus*

Consorcios asociación de dos o más procariotas viviendo en simbiosis íntima

Espiroqueta un procariota alargado y fuertemente curvado o helicoidal que se caracterizan por poseer filamentos axiales para su movilidad)

Heliobacterias procariotas fototrópicos anoxigénicos que contienen bacterioclorofila *g*.

Heterocisto célula diferenciada de una cianobacteria que lleva a cabo la fijación de nitrógeno pero no la fotosíntesis oxigénica

Heterofermentativo relativo a bacterias del ácido láctico, capaces de originar más de un producto de fermentación

Hipertermófilo un organismo cuya temperatura óptima de crecimiento es superior a 80°C

Homofermentativo relativo a bacterias del ácido láctico y que originan ácido láctico como único producto final de fermentación

Metanotrofo un organismo capaz de oxidar metano (CH_4)

Metilotrofo un organismo capaz de oxidar compuestos orgánicos que no contiene enlaces carbono-carbono; si es capaz de oxidar metano también es metanotrófico

Prochlorophyta un procariota fototrofo oxigénico que contiene clorofila *a* y *b* pero carecen de ficobilinas

Prosteca una proyección de citoplasma rodeado de pared celular que a menudo forma un apéndice distintivo

Proteobacteria un linaje principal bacteriano que comprende un gran número de bacilos y cocos Gram negativos

Pseudomonas miembro del género bacteriano *Pseudomonas*, un gran grupo de bacterias Gram negativas con metabolismo obligadamente respiratorio (nunca fermentativo)

Quimiolitotrofos organismos capaces de oxidar compuestos inorgánicos como fuente de energía

Reacción de Stickland fermentación de un par de aminoácidos en la que uno de ellos sirve como donador de electrones y el segundo como aceptor

I FILOGENIA BACTERIANA

En el capítulo precedente se trató sobre las relaciones evolutivas entre los microorganismos. En éste y en los dos capítulos siguientes se extienden estos conceptos a los grupos principales de microbianos. Existiendo miles de microorganismos, evidentemente no podremos considerarlos todos. De este modo, utilizando un árbol filogenético como centro de nuestra presentación, examinaremos especies cultivadas, particularmente bien conocidas y otras en las que se dispone de mucha información fenotípica. Para un conocimiento más detallado sobre la diversidad procariótica el estudiante debe consultar *Bergey's Manual of Sysytematic Baceriology* y *The Prokaryotes* (*véase* Sección 11.10). En este capítulo nos centramos en especies de *Bacteria* mientras que en los dos siguientes lo haremos sobre *Archaea* y *Eukarya*, respectivamente.

12.1 Generalidades de la filogenia de *Bacteria*

Al menos se conocen 17 linajes principales (phyla) de *Bacteria* que derivan del estudio de cultivos de laboratorio, y otros muchos han sido identificados al secuenciar genes de rRNA de *Bacteria* en hábitat naturales. La Figura 12.1 nos da una visión filogenética de *Bacteria*. El phylum filogenético más antiguo contiene el género *Aquifex* y géneros relacionados; todos ellos son quimiolitotrofos, oxidantes de hidrógeno e hipertermofílicos. Otros phyla próximos tales como *Thermosulfobacterium*, *Thermotoga* y la bacteria verde no del azufre (grupo *Chloroflexus*) también contienen especies termofílicas.

Después de las bacterias verdes no del azufre, vemos los deinococos y microorganismos afines, las espiroquetas, las bacterias verdes del azufre y fototróficas, los grupos quimioorganotrofos *Flavobacteria* y *Cytophaga*, las que geman *Plantomyces-Pirella* y *Verrucomicrobium*, las *Chlamydia* y los géneros *Nitrospira* y *Defferribacter* (Figura 12.1). Cada uno de estos grupos se explican con detalle en este capítulo.

El resto de los phyla de las especies cultivables de *Bacteria* constituyen el grupo principal de este capítulo. Incluyen las bacterias Gram positivas, las cianobacterias y las Proteobacterias. Cada uno de ellos es un gran grupo que contiene muchos géneros yson *Bacteria* de los que se tiene mucha información de sus caracteres fenotípicos. Las bacterias Gram positivas pueden separarse en dos subgrupos, los de *bajo* contenido en GC y los de *alto* GC; términos que se refieren al hecho de ser especies que poseen una relación de GC en las bases de sus DNAs (*véase* Sección 11.9), por debajo o por encima de 50% respectivamente. Las bacterias Gram positivas son un gran grupo de *Bacteria* quimioorganotrofas y se describen con detalle en las Secciones 12.19-

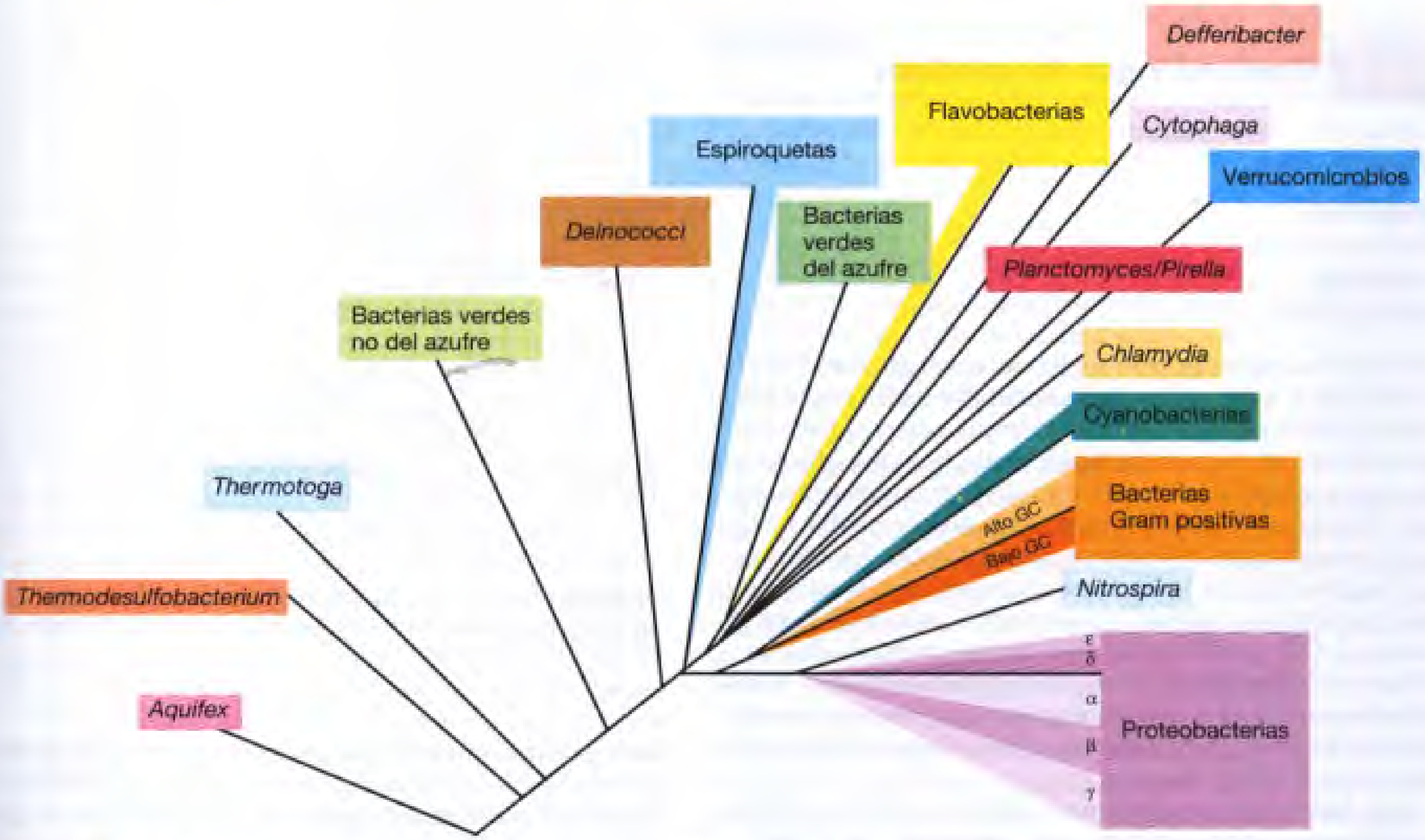

Defferibacter
Flavobacterias
Cytophaga
Espiroquetas
Verrucomicrobios
Deinococci
Bacterias verdes del azufre
Planctomyces/Pirella
Bacterias verdes no del azufre
Chlamydia
Cyanobacterias
Thermotoga
Alto GC
Bajo GC
Bacterias Gram positivas
Thermodesulfobacterium
Nitrospira
ε
δ
α
β
γ
Proteobacterias
Aquifex

Figura 12.1 Árbol filogenético detallado con los principales linajes (phyla) de *Bacteria* basados en la comparación de secuencias del RNA ribosómico 16S.

12.24. Las cianobacterias son procariotas fototróficos oxigénicos, con raíces evolutivas cerca de las *Bacteria* Gram positivas; estos organismos se describen en las Secciones 12.25 y 12.26.

El phylum final en el árbol de *Bacteria* es el de *Proteobacteria* (Figura 12.1). Este grupo es el más grande y más diverso fisiológicamente de todo *Bacteria* (*véanse* las Secciones 12.2-12.19). Las Proteobacterias contienen 5 grupos con varios géneros cada uno, designados por las letras griegas *alfa* α, *beta* β, *gamma* γ, *delta* δ y *épsilon* ε (*véase* Tabla 12.1). Fisiológicamente, las Proteobacterias pueden ser bien fototrofas, quimiolitotrofas o bien quimioorganotrofas. De hecho, veremos en el Capítulo 17 la gran diversidad de mecanismos que generan energía y que son representativos de este grupo.

Con esta introducción a la filogenia del dominio *Bacteria*, procederemos a la descripción de cada phylum. Empezaremos con el mayor de los grupos conocidos del dominio *Baceria*: las Proteobacteria.

II PHYLUM 1: PROTEOBACTERIA

La Tabla 12.1 recoge algunos de los géneros clave de las Proteobacterias. Como grupo se trata de bacterias Gram negativas, muestran una gran diversidad metabólica y representan la mayoría de las bacterias con importancia clínica, industrial o agrícola. Empezamos la descripción con las Proteobacteria *fototróficas*: las bacterias rojas.

12.2 *Bacteria* rojas fototróficas

Géneros clave

Chromatium
Ectothirhodospira
Rhodobacter
Rhodospirillum

Las bacterias rojas fototróficas llevan a cabo la fotosíntesis no oxigénica; a diferencia de las cianobacterias (*véase* Sección 12.25) el oxígeno (O_2) no está implicado. Las bacterias rojas contienen pigmentos de clorofila llamados *bacterioclorofilas* y, además, una variedad de pigmentos *carotenoídicos*. En conjunto, estos pigmentos dan a estas bacterias rojas sus espectaculares colores, generalmente rojo, púrpura o marrón (Figura 12.2). Examinaremos la estructura de estos pigmentos y aprenderemos en el Capítulo 17 cómo se genera el ATP cuando la luz es la fuente primaria de energía (un proceso que se conoce como *fotofosforilación*). Estas bacterias son un grupo morfológicamente diverso y su taxonomía ha implicado diversas líneas filogenéticas, morfológicas y fisiológicas.

Las bacterias rojas forman sistemas fotosintéticos membranosos intracelulares que contienen los pigmentos fotosintéticos. Estas membranas pueden poseer varias morfologías (Figura 12.3) pero en todos los casos se generan por invaginación de la membrana citoplasmática, lo que les permite incrementar el contenido específico de los pigmentos y así utilizar mejor la luz disponible. Cuando crecen con alta disponibilidad de luz poseen pocas membranas, pero cuando escasea la luz, las células están llenas de formaciones membranosas y fotopigmentos.

TABLA 12.1 Géneros más importantes de Proteobacteria[a]

Subdivisión	Géneros	
Alfa	*Acetobacter* *Agrobacterium* *Alcaligenes* *Azospirillum* *Beijerinckia* *Bradyrhizobium* *Brucella* *Caulobacter* *Ehrlichia* *Gluconobacter* *Hyphomicrobium* *Methylocystis*	*Nitrobacter* *Paracoccus* *Rhodospirillum* *Rhodopseudomonas* *Rhodobacter* *Rhodomicrobium* *Rhodovulum* *Rhodopila* *Rhizobium* *Rickettsia* *Sphingomonas* *Zymomonas*
Beta	*Aquaspirillum* *Bordetella* *Burkholderia* *Chromobacterium* *Gallionella* *Leptothrix* *Methylophilis* *Neisseria* *Nitrosomonas*	*Oxalobacter* *Ralstonia* *Rhodocyclus* *Rhodoferax* *Sphaerotilus* *Spirillum* *Thiobacillus* *Zoogloea*
Gamma	*Acetobacter* *Acinetobacter* *Azotobacter* *Chromatium* *Escherichia* *Ectothiorhodospira* *Erwinia* *Francisella* *Halomonas* *Halorhodospira* *Legionella* *Leucothrix* *Methylomonas* *Oceanospirillum*	*Photobacterium* *Pseudomonas* *Methylococcus* *Methylobacter* *Nitrosococcus* *Thiobacillus* *Thiomicrospira* *Thiospirillum* y otras bacterias rojas del azufre *Salmonella* y otras enterobacterias *Vibrio* *Xanthomonas*
Delta	*Acinetobacter* *Aeromonas* *Bdellovibrio* *Desulfuromonas* *Desulfovibrio* y otras bacterias reductoras de sulfato *Francisella*	*Geobacter* *Halomonas* *Moraxella* *Myxococcus* y otras mixobacterias *Pelobacter* *Syntrophobacter*
Épsilon	*Campylobacter* *Helicobacter* *Thiomicrospira*	*Thiovulum* *Wolinella*

[a] Esta tabla solamente incluye géneros bien establecidos de las Proteobacteria. Para una lista completa de Protobacteria y géneros de otros linajes de *Bacteria*, *véase* el Apéndice 2.

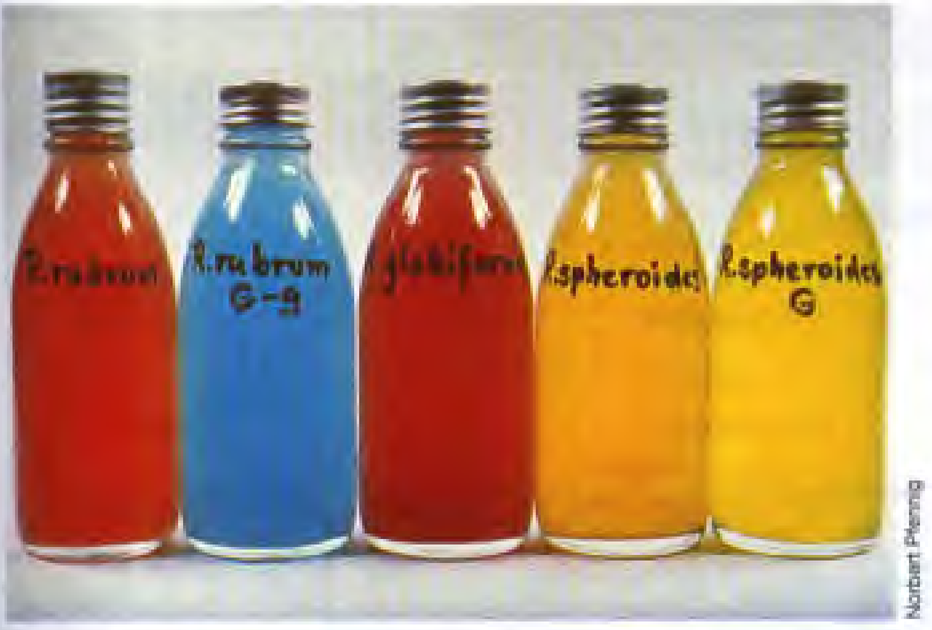


Figura 12.2 Fotografía de cultivos líquidos de diferentes bacterias fototróficas mostrando los colores de las diferentes especies con diversos contenidos en pigmentos carotenoides. El cultivo azul es un mutante defectivo en la síntesis de carotenoides de *Rhodospirillum rubrum* en el que se demuestra cómo la bacterioclorofila *a* es de hecho de color azul. La botella del extremo derecho (*Rhodobacter sphaeroide*, cepa G) carece de uno de los carotenoides de la estirpe silvestre y por ello es más verdoso.

Bacteria rojas del azufre

Las bacterias rojas que utilizan sulfuro de hidrógeno (H_2S) como un donador de electrones para la reducción fotosintética del CO_2, se las conoce como bacterias *rojas del azufre* (Tabla 12.2). El sulfuro es oxidado a azufre elemental (S^0) que es almacenado como gránulos dentro de las células (Figura 12.4); más tarde el azufre desaparece a medida que se oxida a sulfato. Muchas de estas bacterias rojas también pueden reducir otros compuestos azufrados como donadores de electrones fotosintéticos tales como el tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$), siendo éste un compuesto clave para cultivar estos microorganismos en el laboratorio. Actualmente, se incluyen en el grupo gamma de Proteobacteria.

Las bacterias rojas del azufre se encuentran habitualmente en zonas anóxicas de lagos bien iluminados y otros hábitat acuáticos donde el H_2S se acumula. También en los «manantiales sulfurosos» en los que el H_2S de origen biológico o geoquímico puede disparar el rápido crecimiento de este tipo de bacterias rojas del azufre (Figura 12.5). Los lagos más favorables para el crecimiento de las bacterias rojas del azufre se denominan lagos *meromícticos* (permanentemente estratificados). Los lagos meromícticos se estratifican porque poseen agua más densa en el fondo (normalmente salina) y menos densa (normalmente agua dulce) cerca de la superficie. Si existe suficiente sulfato para que sea reducido, el sulfuro originado en los sedimentos difunde hacia arriba, hacia las capas anóxicas de las aguas y allí las bacterias rojas del azufre crecen masivamente, por lo general, asociadas con las bacterias fototróficas verdes del azufre (Figura 12.5*c*).

El género *Ectothiorhodospira* y *Halorhodospira* tienen un interés especial porque, a diferencia de otras bacterias rojas del azufre, estos organismos oxidan H_2S y producen S^0 *fuera* de la célula (Figura 12.4*f*) y también porque algunas de sus especies son halófilas extremas, encontrándose entre los más halófilos del mundo procariótico. Estos organismos se encuentran típicamente en ambientes marinos, lagos salados, lagos bicarbonatados y salinas.

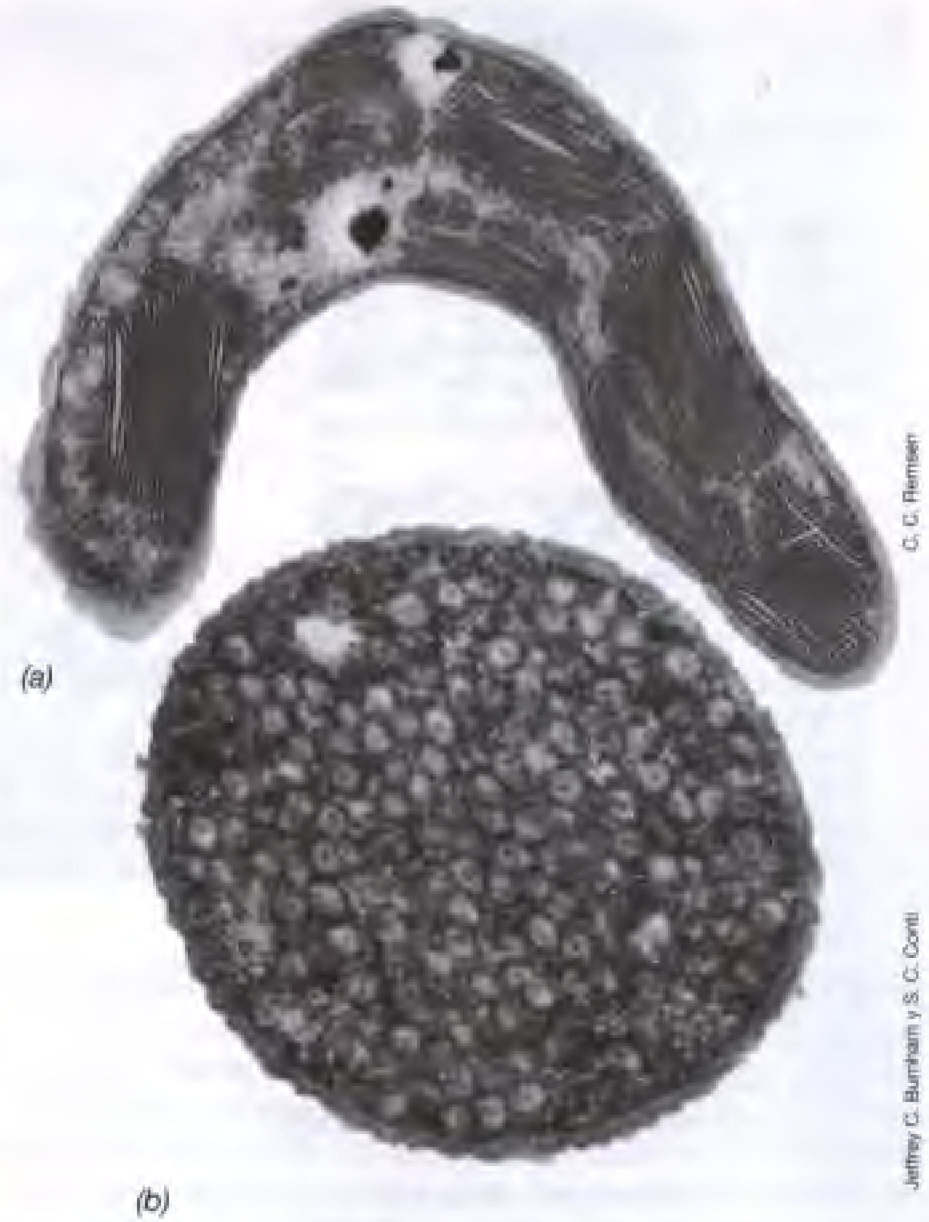


Figura 12.3 Sistemas de membranas de bacterias rojas fototróficas vistas al microscopio electrónico. (a) *Ectothiorhodospira mobilis* mostrando las membranas fotosintéticas en láminas planas (lamelas). (b) *Allochromatium vinosum*, mostrando las membranas como vesículas individuales de forma esférica.

Bacteria rojas no del azufre

Estas bacterias se denominan «no del azufre» porque inicialmente se pensaba que eran incapaces de usar sulfuros como donadores de electrones para la reducción del CO_2 hasta material celular. Sin embargo, el sulfuro sí *puede* ser utilizado por la mayoría de las especies, aunque los niveles de este compuesto que pueden utilizar las bacterias rojas *del azufre* son tóxicos para la mayoría de las bacterias rojas *no del azufre*. Algunas de las bacterias rojas no del azufre también pueden crecer anaeróbicamente en la oscuridad utilizando la fermentación o la respiración anaeróbica, y la mayoría pueden crecer anaeróbicamente en la oscuridad por respiración. En estas últimas condiciones el donador de electrones puede ser un compuesto orgánico o incluso en algunas especies un compuesto inorgánico tal

TABLA 12.2 Géneros y características de las bacterias rojas del azufre[a]

Característica	Género	Número de especies	DNA (GC mol %)
Azufre depositado externamente:			
Espirilos con flagelos polares	*Ectothiorhodospira*	9	62-67
Espirilos y alcalofílicos extremos	*Thiorhodospira*	1	57
Espirilos y halófilos extremos	*Halorhodospira*	3	50-69
Azufre depositado internamente:			
No contienen vesículas de gas			
son ovales, bacilos y con flagelos polares	*Chromatium;* *Allochromatium;* *Halochromatium;* *Rhabdochromatium;* *Thermochromatium;* *Isochromatium;* *Marichromatium*	23	48-70
Cocos alcalofílicos	*Thioalkalicoccus*	1	64
Cocos con bacterioclorofila *b*	*Thioflavicoccus*	1	66
Cocos	*Thiorhodococcus*	1	67
Cocos, diplococos, tétradas, inmóviles; Células de 1,2-3 μm de diámetro	*Thiocapsa*	5	63-70
Cocos u ovales, flagelos polares; Células de 2,5-3 μm de diámetro	*Thiocystis*	4	61-68
Cocos de 1,5-2,5 μm de diámetro	*Thiohalocapsa*	1	66
Cocos de 1-2 μm de diámetro	*Thiorhodococcus*	1	67
Cocos de 1,2-1,5 μm de diámetro	*Thiococcus*	1	69
Espirilos grandes con flagelo polar	*Thiospirillum*	1	45
Espirilos pequeños	*Thiorhodovibrio*	1	61-62
Contienen vesículas de gas			
Cocos irregulares, ovales, inmóviles	*Amoebobacter*	4	63-65
Cocos irregulares en paquetes de 4-16 células	*Thiolamprovulum*	1	
Bacilos	*Lamprobacter*	1	64
Cocos, ovales con flagelos polares	*Lamprocystis*	1	64
Bacilos inmóviles formando una malla irregular	*Thiodictyon*	2	65-66
Cocos inmóviles formando capas planas o tétradas	*Thiopedia*	1	62-64

[a] Desde un punto de vista filogenético, todos son miembros de la subdivisión gamma de Proteobacteria (Figura 12.1).

como el hidrógeno H_2. No obstante, es la gran capacidad de este grupo para practicar la *fotoheterotrofia* (donde la luz es la fuente de energía y un compuesto orgánico es la fuente de carbono, *véase* Figura 17.1), la responsable de su éxito en la naturaleza. Las bacterias rojas no del azufre son nutricionalmente muy diversas y pueden utilizar como fuente de carbono sustancias tales como ácidos grasos u orgánicos así como aminoácidos, azúcares, alcoholes, e incluso, compuestos aromáticos tales como el benzoato. La mayoría pueden crecer también fotoautotróficamente con (CO_2 + H_2) o (CO_2 + bajos niveles de H_2S).

El enriquecimiento y aislamiento de las bacterias rojas no del azufre son fáciles, utilizando un medio de sales minerales suplementado con un ácido orgánico como fuente de carbono. Tales tipos de medios, inoculados con lodo, agua de un lago o de una alcantarilla, se incuban anaeróbicamente con luz e invariablemente favorecen el crecimiento de bacterias rojas no del azufre. Los medios de enriquecimiento pueden hacerse aún más selectivos omitiendo fuentes de nitrógeno fijadas (por ejemplo, el NH_4^+) o fuentes de nitrógeno de tipo orgánico (como por ejemplo el extracto de levadura o la peptona) y proporcionando una superficie gaseosa de nitrógeno N_2; prácticamente todas las bacterias rojas no del azufre pueden fijar N_2 (*véase* Sección 17.28) y crecerán en estas condiciones más que otros posibles competidores.

La diversidad morfológica de las bacterias rojas no del azufre es típicamente la de las bacterias rojas del azufre (Tabla 12.3 y Figura 12.6), siendo, por tanto, un grupo heterogéneo en este sentido. Todas las bacterias rojas no del azufre que se han aislado hasta la fecha son invariablemente Proteobacterias alfa o beta (Figura 12.1).

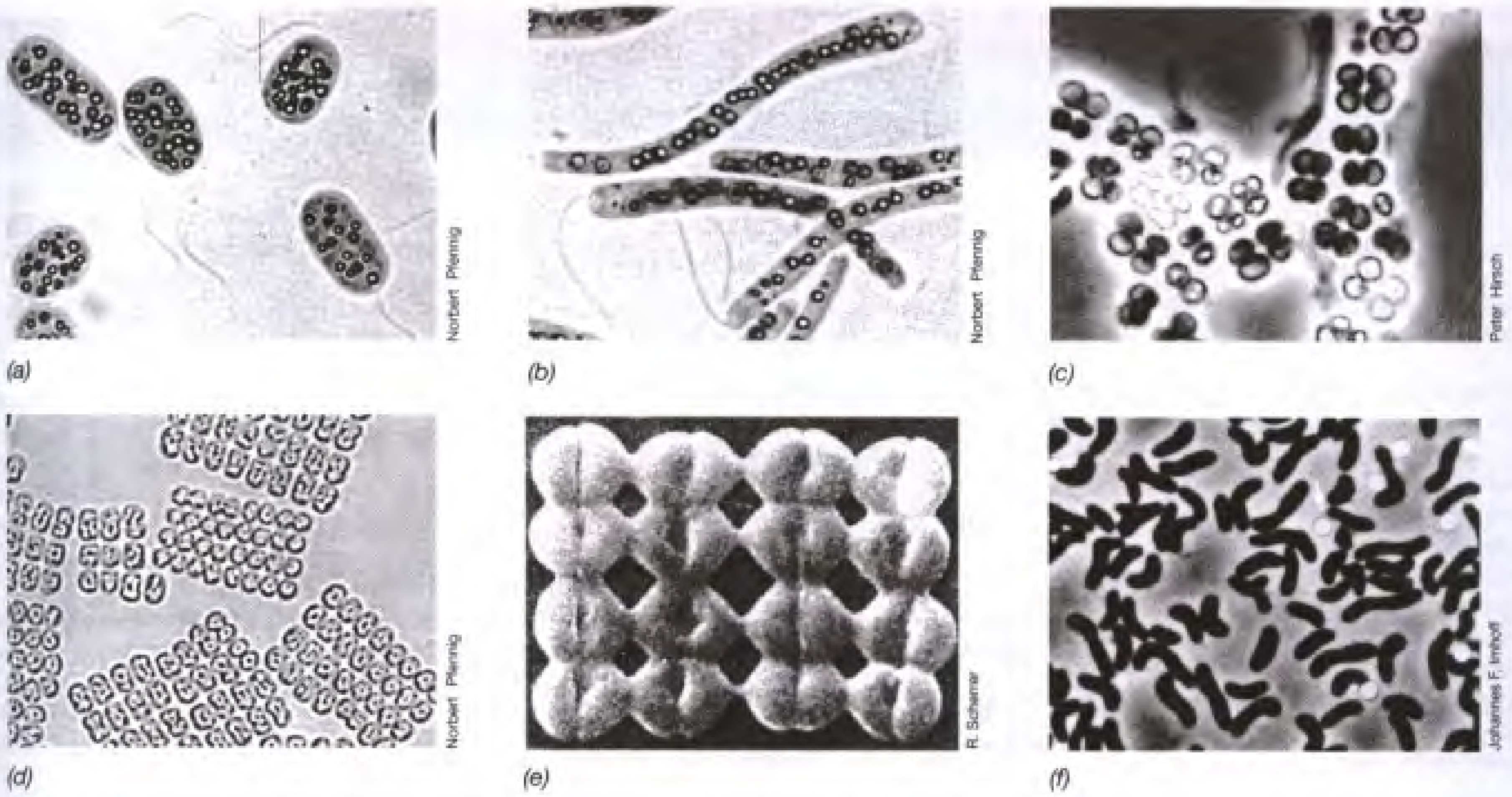
✓ 12.2 Revisión de conceptos

Las bacterias rojas son fototrofos anoxigénicos que crecen fototróficamente obteniendo el carbono del CO_2 + H_2S (las bacterias rojas del azufre) o de fuentes orgánicas (las bacterias rojas no del azufre). Algunas bacterias rojas no del azufre están altamente diversificadas fisiológicamente y, en conjunto, sus actividades fotoautotróficas pueden tener un gran significado desde el punto de vista ecológico. Las bacterias rojas se incluyen en las subdivisiones alfa, beta y gamma de Proteobacterias.

✓ ¿Qué se entiende por el término *anoxigénico*?

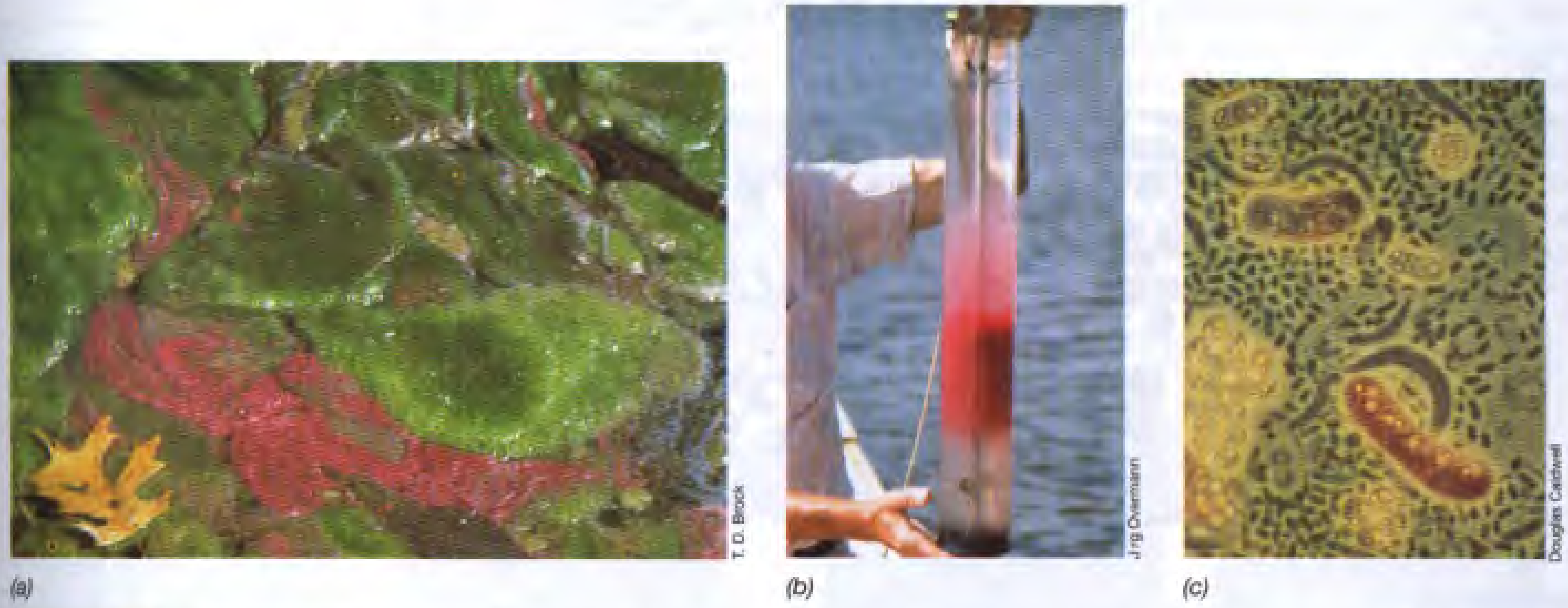
✓ Dé una razón importante de por qué la fotosíntesis de las bacterias rojas no del azufre no tiene lugar en condiciones aeróbicas.

✓ ¿Pueden crecer las bacterias rojas en ausencia de luz?



(a) (b) (c) (d) (e) (f)

Figura 12.4 Micrografías de campo claro de bacterias rojas del azufre (*véase* también la Tabla 12.2). (a) *Chromatium okenii;* las células miden alrededor de 5 µm de ancho. Nótense los glóbulos de azufre elemental dentro de las células. (b) *Thiospirillum jenense*, una bacteria espiral muy grande con flagelos polares; las células miden unos 30 µm de largo. Nótense los glóbulos de azufre. (c) *Thiocapsa*; las células miden alrededor de 2 µm de ancho. (d) *Thiopedia rosea* con diámetro de 1,5 µm. (e) Micrografía electrónica de barrido de un conjunto planar de 16 células de *Thiopedia rosea* mostrando los principales planos de división (f) Micrografía de contraste de fases de *Ectothiorhodospira mobilis*. Diámetro celular de 0,8 µm. Nótense los glóbulos de azufre extracelular. Compare la foto de *Chromatium okenii* con los dibujos de las bacterias rojas del azufre realizadas por el gran microbiólogo ruso Sergei Winogradsky, hace unos 115 años (*véanse* Sección 1.6 y Figura 1.15). Aunque Winogradsky nunca obtuvo cultivos axénicos (puros) de estos organismos, estudió su historia natural y la transformación de los compuestos de azufre.



(a) (b) (c)

Figura 12.5 Crecimiento en hábitat naturales de bacterias rojas del azufre. (a) *Thiopedia roseopersicina* en un manantial azufrado en Madison, Wisconsin. Las bacterias crecen cerca del fondo del manantial y flotan hacia la superficie (debido a las vesículas de gas) cuando se remueve el agua. El color verde es debido al alga eucariótica *Spirogyra*. (b) Muestra de agua de 7 m en el lago Mahoney, Columbia Británica. El organismo principal es *Amoebobacter purpureus*. (c) Micrografía de contraste de fases de bacterias rojas de un pequeño lago estratificado en Michigan. Bacterias rojas del azufre tales como especies de *Chromatium* (bacilos largos) y *Thiocystis* (cocos pequeños).

TABLA 12.3 Géneros y características de las bacterias rojas no del azufre

Características	Género	Número de especies	Grupo 16S rRNA[a]	DNA (GC mol %)
Espirilos, flagelos polares	*Rhodospirillum;*	15	Alfa	62-68
	Phaeospirillum;			
	Rhodovibrio;			
	Rhodothalassium;			
	Roseospira;			
	Rhodospira;	1	Alfa	66
	Roseospirillum	1	Alfa	71
Bacilos, flagelos polares; se dividen por gemación	*Rhodopseudomonas;*	15	Alfa	64-72
	Rhodoplanes;	2	Alfa	66-69
	Rhodobium	2	Alfa	61-65
Bacilos; se dividen por división binaria	*Rhodobacter*	8	Alfa	62-71
Ovoides o cocobacilos	*Rhodovulum*	4	Alfa	64-68
Ovoides y alcalofílicos	*Rhodobaca*	1	Alfa	59
Ovoides, flagelos peritricos; se dividen por gemación y forman hifas	*Rhodomicrobium*	1	Alfa	61-63
Cocos grandes y acidófilos (pH 5 óptimo)	*Rhodopila*	1	Alfa	66
Cocos pequeños y alcalófilos (pH 9 óptimo)	*Rhodobaca*	1	Alfa	59
En forma de anillo o espirilados	*Rhodocyclus*	3	Beta	64-66
Bacilos incurvados	*Rubrivivax*	1	Beta	70-72
Bacilos incurvados	*Rhodoferax*	2	Beta	59-60

[a] Todas son miembros de Proteobacteria (*véase* Figura 12.1 y Tabla 12.1).

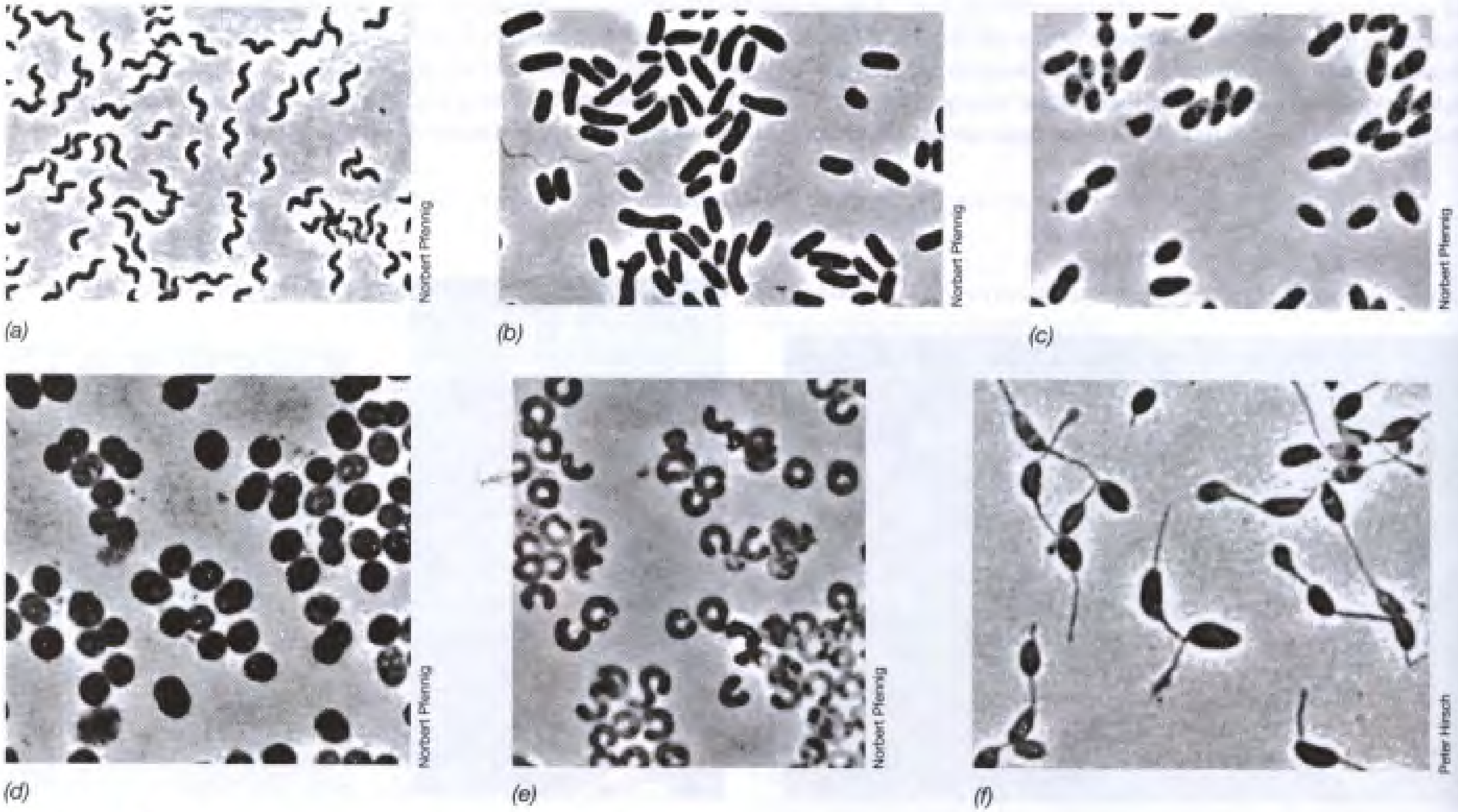


Figura 12.6 Representantes de diversos géneros de bacterias rojas no del azufre (*véase* también la Tabla 12.3). (a) *Phaseospirillum fulvum*; las células miden 3 μm de largo. (b) *Rhodopseudomonas acidophila*; las células miden 4 μm de largo. (c) *Rhodobacter sphaeroides*; la anchura celular es de 1,5 μm. (d) *Rhodopila globiformis*; el diámetro de la célula es de 1,6 μm. (e) *Rhodocyclus purpureus*; el diámetro es de 0,7 μm. (f) *Rhodomicrobium vannielii*; el diámetro de la célula es de 1,2 μm. Todas las bacterias rojas no del azufre son capaces de crecer tanto aeróbicamente en la oscuridad como fototróficamente (condiciones anóxicas y luz), pero algunas especies como *P. Fulvum*, solo pueden respirar en tensiones reducidas de oxígeno (es decir, en condiciones de microaerofilia, *véase* sección 6.13).

TABLA 12.4 Características de las bacterias nitrificantes

Características	Género	Grupo Filogenético[a]	DNA (GC mol %)	Hábitat
Oxidan amonio:				
Gram negativas, bacilos cortos o largos, móviles por flagelos polares o inmóviles y sistema membranoso periférico	*Nitrosomonas*	Beta	45-53	Suelos, aguas residuales, agua dulce
Cocos grandes móviles con membranas periféricas o vesiculares	*Nitrosococcus*	Gamma	49-50	Agua dulce y de mar
Espirales móviles (flagelos peritricos) sin membranas aparentes	*Nitrosospira*	Beta	54	Suelo
Pleomórficas, lobuladas, células compartimentalizadas, móviles por flagelos peritricos	*Nitrosolobus*	Beta	54	Suelo
Bacilos incurvados	*Nitrosovibrio*	—	54	Suelo
Oxidan nitrito:				
Bacilos cortos se dividen por gemación ocasionalmente móviles (un flagelo subterminal) y un sistema de membranas en un extremo	*Nitrobacter*	Alfa	59-62	Suelo, agua dulce y de mar
Bacilos largos inmóviles y sistema de membrana no aparente	*Nitrospina*	Delta	58	Agua de mar
Cocos grandes (uno o dos flagelos subterminales) con membranas tubulares dispuestas aleatoriamente	*Nitrococcus*	Gamma	61	Agua de mar
Células helicoidales o vibriodes; inmóviles y sin membranas internas	*Nitrospira*	Grupo Nitrospira	50	Agua de mar y suelo

[a] Filogenéticamente todas las nitrobacterias examinadas hasta la fecha son Proteobacteria excepto *Nitrospira*, que constituye su propio linaje filogenético (Figura 12.1).

12.3 *Bacteria* nitrificantes

Géneros clave

Nitrosomonas
Nitrobacter

En el Capítulo 17 se discutirán las bases conceptuales de la quimiolitotrofia. Las bacterias quimiolitotróficas constituyen una unidad fisiológica basada en su capacidad de utilizar donadores de electrones *inorgánicos* como fuentes de energía. La mayoría de los quimiolitotrofos son capaces de llevar a cabo un crecimiento autotrófico y, en ese sentido, comparten una importante característica fisiológica con las bacterias fototróficas y con las cianobacterias. Los quimiolitotrofos mejor estudiados son aquellos capaces de oxidar compuestos reducidos de azufre o de nitrógeno y las bacterias que oxidan hidrógeno. En este apartado y en las dos secciones siguientes nos centraremos en su estudio.

Nitrosificantes y nitrificantes

Las bacterias capaces de crecer quimiolitotróficamente a expensas de compuestos inorgánicos reducidos del nitrógeno se denominan **bacterias nitrificantes.** Se reconocen diversos géneros en función de su morfología y los pasos particulares en la secuencia de oxidación de los sustratos (Tabla 12.4). Aunque son morfológicamente heterogéneas, constituyen un grupo bastante coherente filogenéticamente a excepción del género *Nitrospira* que constituye su propio phylum *Bacteria* (*véanse* Figura 12.1 y Sección 12.38).

No se conoce ningún quimiolitotrofo que lleve a cabo la oxidación completa desde amonio hasta nitrato; por ello, la **nitrificación** en la naturaleza resulta de la acción secuencial de dos grupos separados de organismos, las **bacterias oxidantes de amoníaco** o **nitrosificantes** (Figura 12.7) y **las bacterias oxidantes de nitritos,** las verdaderas bacterias **nitrificantes** (productoras de nitrato) (Figura 12.8). Las bacterias nitrosificantes, productoras de nitroso, tienen géneros con el prefijo «Nitroso», mientras que las nitrifican-

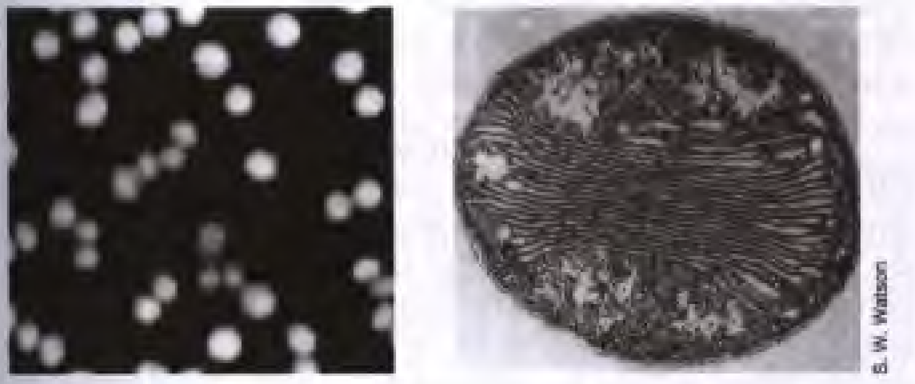

S. W. Watson

Figura 12.7 Micrografía de contraste de fases (izquierda) y electrónica (derecha) de la bacteria nitrificante *Nitrosococcus oceani.* Diámetro celular de 2 µm.

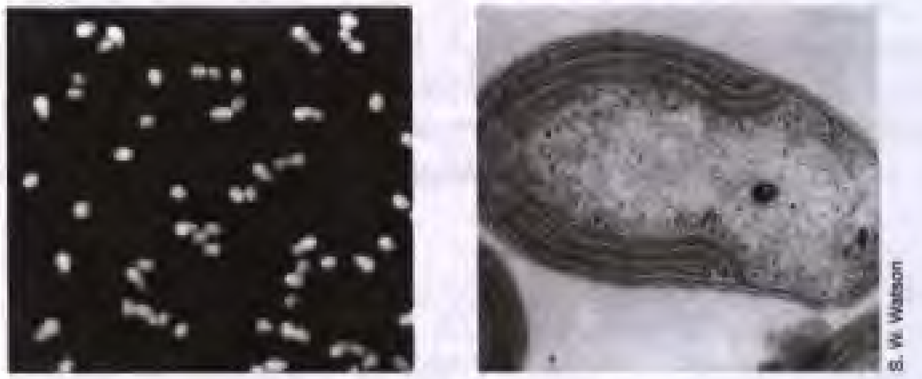

S. W. Watson

Figura 12.8 Micrografías de contraste de fases (izquierda) y electrónica (derecha) de la bacteria nitrificante *Nitrobacter winogradskyi.* Diámetro celular de 0,7 µm.

tes van precedidas, por lo general, del prefijo «Nitro»; *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* son los géneros principales (Tabla 12.4). Históricamente las bacterias nitrificantes fueron los primeros organismos en los que se demostró la quimiolitotrofia; Winogradsky demostró que eran capaces de producir materia orgánica y masa celular cuando se les suplemetaba con CO_2 como única fuente de carbono (*véase* el cuadro: Legado de Winogradsky, Capítulo 17).

Muchas especies de bacterias nitrificantes poseen un sistema membranoso interno verdaderamente sofisticado y complejo, y muy semejante al que se encuentra en sus parientes filogenéticos, las bacterias rojas fototróficas (*véase* Sección 12.2) y las bacterias oxidantes de metano (metanotróficas) (*véase* Sección 12.6). En las membranas se ubica la enzima clave de la oxidación del amoníaco, *amoníaco monooxigenasa*, que oxida el NH_3 hasta hidroxilamina; este último es oxidado a nitrito NO_2^- por las bacterias nitrosificantes (Figura 12.9) y explicamos la bioquímica de este proceso de manera más detallada en la Sección 17.24. El NO_2^- generado en esta reacción es oxidado hasta nitrato NO_3^- por las bacterias nitrificantes (Tabla 12.4 y Figura 12.9).

Ecología, aislamiento y cultivo

Las bacterias nitrificantes están ampliamente distribuidas en el suelo y en el agua. Están presentes en grandes cantidades en hábitat donde existe una cantidad de amoníaco considerable, tales como los lugares en los que se produce una descomposición proteica (amonificación) elevada y en lugares donde se lleva a cabo el tratamiento de aguas residuales. Las bacterias nitrificantes se desarrollan particularmente bien en lagos y cauces fluviales que reciben aporte de aguas residuales normalmente ricas en amoníaco.

Los cultivos de enriquecimiento de las bacterias nitrificantes se realiza utilizando medios con sales minerales que contienen ion amonio o nitrito como donadores de electrones y bicarbonato (HCO_3^-) como única fuente de carbono. Debido al ineficiente crecimiento de este tipo de organismos (*véase* Sección 17.12), el desarrollo de turbidez no es visible incluso después de que se haya producido un proceso prolongado de nitrificación, y, por ello, una forma fácil de monitorizar el crecimiento es determinar la producción de nitrito (con amoníaco como donador de electrones) o la desaparición de nitrito o producción de nitrato (con nitrito como donador de electrones). La mayoría de las bacterias nitrificantes son quimiolitotrofas estrictas. Las especies de *Nitrobacter* son una excepción, ya que pueden crecer quimioorganotróficamente utilizando acetato o piruvato como única fuente de carbono y energía.

Bacterias nitrosificantes

1. $NH_3 + O_2 + 2\,e^- + 2\,H^+ \rightarrow NH_2OH + H_2O$
2. $NH_2OH + H_2O + \frac{1}{2}\,O_2 \rightarrow NO_2^- + 2\,H_2O + H^+$

Sum: $NH_3 + 1\frac{1}{2}\,O_2 \rightarrow NO_2^- + H_2O$

$\Delta G^{0\prime} = -275$ kJ/reacción

Bacterias nitrificantes

$NO_2^- + \frac{1}{2}\,O_2 \rightarrow NO_3^-$

$\Delta G^{0\prime} = -74{,}1$ kJ/reacción

Figura 12.9 Reacciones que intervienen en la oxidación de compuestos de nitrógeno inorgánico por bacterias nitrificantes quimiolitotrofas, (*véanse* también Figuras 17.32 y 17.33).

12.4 *Bacteria* oxidantes del azufre y del hierro

Géneros clave

Thiobacillus
Achromatium
Beggiatoa

La capacidad de crecer quimiolitotróficamente sobre compuestos reducidos de azufre es una propiedad interesante de un grupo diverso de Proteobacterias (Tabla 12.5). Se pueden discernir dos clases ecológicamente amplias de bacterias que oxidan el azufre, aquellas que viven a pH neutro y las que lo hacen a pH ácidos. Algunos de los acidófilos tienen también la capacidad de crecer quimiolitotróficamente utilizando el ion ferroso (Fe^{2+}) como donador de electrones. Hablaremos de la biogeoquímica de las bacterias acidófilas que oxidan azufre o hierro en las Secciones 19.13-19.16 y la bioquímica de estos procesos en las Secciones 17.10 y 17.11.

Thiobacillus y *Achromatium*

El género *Thiobacillus* contiene diversas especies de bacterias Gram negativas en forma de bacilo, morfológicamente indistinguibles de la mayoría de los bacilos Gram negativos típicos (Figura 12.10*a*) y son los mejor estudiados de los quimiolitotrofos del azufre. Filogenéticamente, las especies de *Thiobacillus* se dispersan entre Proteobacterias y las especies se incluyen tanto en las subdivisiones alfa, beta y gamma. Los compuestos del azufre usados comúnmente como donadores de electrones en el metabolismo quimiolitotrófico son el H_2S, S^0 y $S_2O_3^-$ y las reacciones energéticas implicadas son las siguientes:

$$H_2S + 2\,O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+ \qquad \Delta G^{0\prime} = -798\text{kJ/reacción}$$

$$S^0 + H_2O + 1\tfrac{1}{2}\,O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+ \qquad \Delta G^{0\prime} = -587\text{ kJ/reacción}$$

$$S_2O_3^{2-} + H_2O + 2O_2 \rightarrow 2SO_4^{2-} + 2H^+ \qquad \Delta G^{0\prime} = -818\text{ kJ/reacción}$$

Es evidente que en estas reacciones se libera una gran cantidad de energía y como veremos en la Sección 17.10 una parte de esta energía es atrapada como ATP a partir de reacciones trasportadoras de electrones que conducen a la producción de la fuerza motriz de protones. Además, estas reacciones generan grandes cantidades de ácido sulfúrico, por lo que las especies de *Thiobacillus* son acidófilas. Una de las especies acidófilas, *T. ferrooxidans*, también puede crecer quimiolitotróficamente por la oxidación de hierro ferroso siendo el principal agente bio-

TABLA 12.5 Características fisiológicas de procariotas quimiolitotrofos oxidantes de azufre

Género y/o especie	Donador inorgánico de electrones	Rango de pH de crecimiento	Grupo filogenético	DNA (GC mol %)
Especies de *Thiobacillus* que crecen mal en medios orgánicos:				
T. thioparus	H_2S, sulfuros, S^0, $S_2O_3^{2-}$	6-8	Beta	61-66
T. denitrificans[b]	H_2S, S^0, $S_2O_3^{2-}$	6-8		63-68
T. neapolitanus	S^0, $S_2O_3^{2-}$	6-8		52-56
T. thiooxidans	S^0	2-4		51-53
T. ferrooxidans	S^0, sulfuros metálicos, Fe^{2+}	2-4		55-65
Especies de *Thiobacillus* que crecen bien en medios orgánicos:				
T. novellus	$S_2O_3^{2-}$	6-8	Beta	66-68
T. intermedius	$S_2O_3^{2-}$	3-7		64
Filamentosos azufrados y quimiolitotrofos:				
Beggiatoa	H_2S, $S_2O_3^{2-}$	6-8	Gamma	37-51
Thiothrix	H_2S	6-8	Gamma	52
Thioploca[c]	H_2S, S^0	—	Gamma	—
Otros géneros:				
Achromatium[c]	H_2S	—	Gamma	—
Thiomicrospira[a]	$S_2O_3^{2-}$, H_2S	6-8	Gamma	36-44
Thiosphaera[b]	H_2S, $S_2O_3^{2-}$, H_2	6-8	Alfa	66
Thermothrix[a]	H_2S, $S_2O_3^{2-}$, SO_3^-	6.5-7.5	Beta	—
Thiovulum	H_2S, S^0	6-8	Épsilon	—

[a] Una de sus especies es capaz de utilizar NO_3^- en anaerobiosis.

[b] Anaerobios facultativos, utilizan NO_3^- como aceptor de electrones anaeróbicamente.

[c] No se dispone todavía de cultivos axénicos.

[d] *Thiosphaera pantotropha* tiene la secuencia de 16S rRNA exactamente igual a *Paracoccus denitrificans*.

lógico responsable de la oxidación de este metal (*véase* Sección 19.14). La pirita de hierro (FeS_2) es la principal fuente de Fe^{2+} (como también lo es de sulfuro) y la oxidación de la pirita por este mecanismo puede ser beneficiosa para recuperar el hierro capturado en los sulfuros, a la vez que desastroso desde el punto de vista ecológico por la acidificación concomitante y la liberación de metales pesados asociados a la pirita (*véanse* Secciones 19.14 y 19.16).

Achromatium es un quimiolitotrofo oxidante de azufre esférico que se aísla normalmente en agua dulce con abundantes sedimentos ricos en sulfuros. Las células de *Achromatium* son cocos muy grandes con diámetros entre 10-100 μm (Figura 12.10*b*). El análisis filogenético de las poblaciones naturales de *Achromatium* (*véanse* Secciones 11.6 y 18.5) han demostrado que quizá existan especies diferentes del género (probablemente cada una con distinto tamaño), aunque aún no se ha conseguido su aislamiento en cultivo axénico o puro. Filogenéticamente *Achromatium* pertenece a la subdivisión gamma de Proteobacteria estando específicamente relacionada con las bacterias rojas fototróficas, tales como la bacteria fototrófica *Chromatium* (*véase* Sección 12.2). Como *Chromatium*, las células de *Achromatium* acumulan internamente azufre elemental (Figura 12.10*b*); más tarde, estos granos desaparecen a medida que se van oxidando a sulfato. Las células de *Achromatium* también pueden almacenar grandes gránulos de calcita ($CaCO_8$) intracelularmente (Figura 12.10*b*), posiblemente como fuente de carbono para el crecimiento.

Cultivo

Algunos quimiolitotrofos del azufre son quimiolitotrofos estrictos, encerrados en su propia forma de vida metabólica y estrictos a usar compuestos inorgánicos en lugar de los orgánicos como donadores de electrones. Cuando crecen así son también autótrofos, convirtiendo el CO_2 en material celular utilizando el ciclo de Calvin (*véase* Sección 17.6). Otros quimiolitotrofos del azufre son *quimiolitotrofos facultativos;* facultativos en el sentido de que pueden crecer quimiolitotróficamente (y, por tanto, también como autótrofos) o quimioorganotróficamente (Tabla 12.5). Además existen organismos, como es el caso de *Beggiatoa*, que pueden obtener energía de la oxidación de azufre inorgánico pero que carecen de las enzimas del ciclo de Calvin y requieren fuentes de carbono orgánico. Este estilo metabolismo se denomina *mixotrofía*.

Beggiatoa

Los organismos de este género son filamentosos, deslizantes y oxidan azufre, normalmente de un diámetro grande y formando largas cadenas de células bacilares unidas extremo con extremo (Figura 12.11); los filamentos se retuercen sobre sí mismos y con otros dando lugar finalmente a una especie de ovillo. *Beggiatoa* se encuentra en la naturaleza principalmente en hábitat ricos en H_2S,

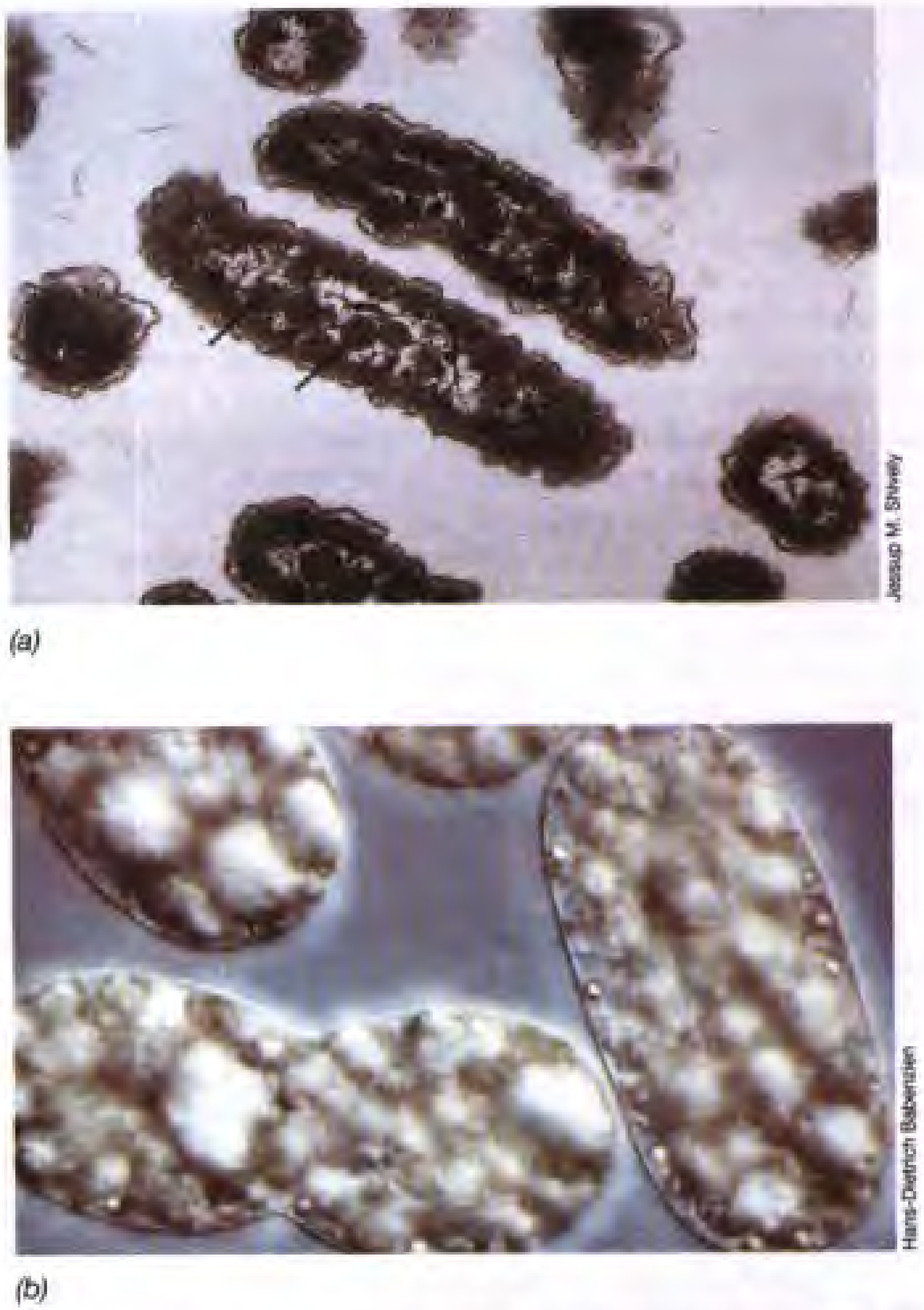


Figura 12.10 (a) Quimiolitotrofos del azufre no filamentosos. Corte fino del oxidante de azufre *Thiobacillus neapolitanus*. Diámetro celular de 0,5 µm. Nótense los cuerpos poliédricos (carboxisomas) distribuidos por toda la célula (flechas). (b) *Achromatium*. Aislado de un pequeño lago en Alemania y fotografiado con microscopio óptico de Nomarski. Las pequeñas estructuras globulares cerca de la periferia celular (flecha) son depósitos de azufre elemental, mientras que los gránulos grandes son de carbonato cálcico. Diámetro de una célula de *Achromatium* de 25 µm.

tales como manantiales sulfurosos (Figura 12.11*b*), depósitos de algas en descomposición, capas de lodos y aguas contaminadas con aguas residuales. En estos hábitat *Beggiatoa* está llena de gránulos de azufre (Figura 12.11*a*). *Beggiatoa* también se encuentra en fuentes hidrotermales submarinas (*véase* Sección 19.8). *Beggiatoa* fue el microorganismo con el que Winogradsky demostró por vez primera que un ser vivo podía oxidar H_2S hasta S^0 y después hasta SO_4^{2-}, lo que le llevó al concepto de quimiolitotrofia (*véase* el cuadro: «La herencia de Winogradsky» Capítulo 17). Aunque algunas cepas de *Beggiatoa* son verdaderas autótrofas quimiolitotróficas, la mayoría crecen mejor en mixotrofia utilizando azufre reducido como donador de electrones y compuestos orgánicos como fuentes de carbono.

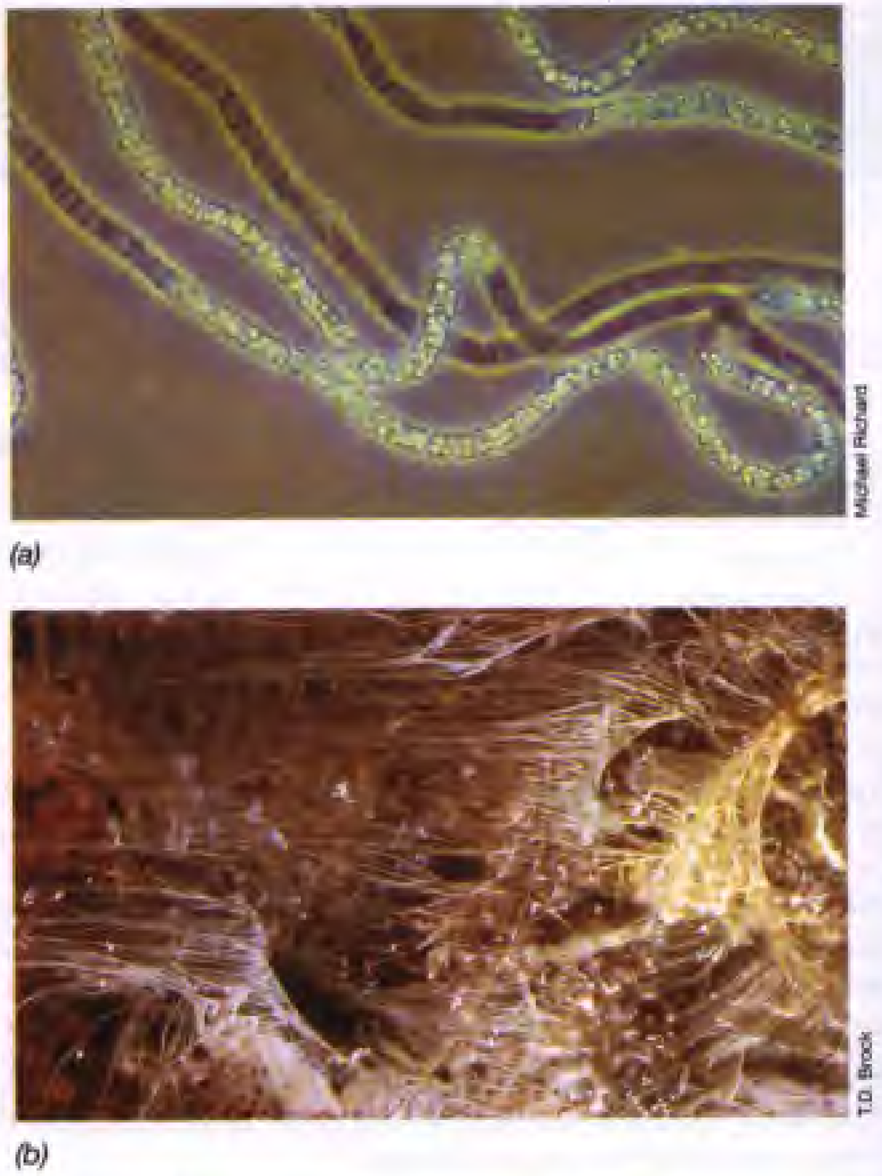


Figura 12.11 Bacterias oxidantes de azufre y filamentosas. (a) Micrografía de contraste de fases de una especie de *Beggiatoa* aislada de una planta de tratamiento de aguas residuales. Nótese la abundancia de gránulos de azufre elemental en algunas de las células. (b) Bacterias oxidantes de azufre en un pequeño arroyo. Las células filamentosas se retuercen hasta formar grandes estructuras; el color blanco es debido al abundante azufre elemental.

Un hábitat interesante de *Beggiatoa* lo constituye la rizosfera de las plantas [arroz, aneas (*N. de la R.:* planta de la familia de las tifáceas, espadaña, caña) y otras plantas de pantanos y ciénagas] que viven en suelos encharcados y, por tanto, anóxicos. Tales plantas bombean oxígeno a sus raíces, de tal manera que existe una interfase óxica/anóxica muy bien definida entre la raíz y el suelo. *Beggiatoa* (y probablemente, otras bacterias del azufre) se desarrollan en esta interfase y desempeñan una función muy beneficiosa para las plantas al oxidar el H_2S (y así destoxifican el suelo).

Beggiatoa y otras bacterias filamentosas como es el caso de *Sphaerotilus* (*véase* Sección 12.15) pueden causar serios problemas en las instalaciones de alcantarillado así como en las lagunas industriales de aguas de desecho tales como fábricas de pasta de papel, de envasado, cerveceras y de molienda de grano. Estos problemas, generalmente conocidos como *engrosamiento*, ocurren cuando las bacterias filamentosas crecen en un porcentaje mayor que la biota normal del sistema de desecho, dando lugar a detritus floculares poco consistentes en vez de los fóculos normales de mayor consistencia y más manejables com-

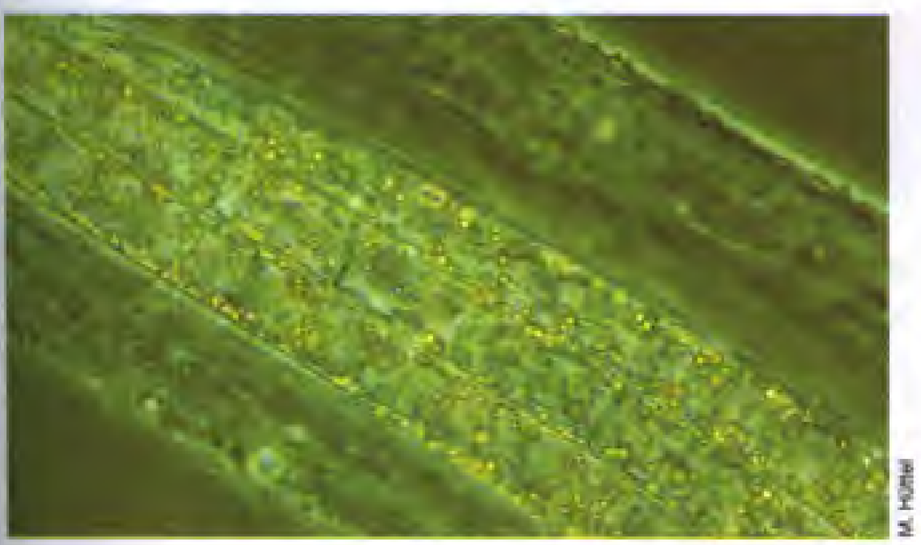

M. Hüttel

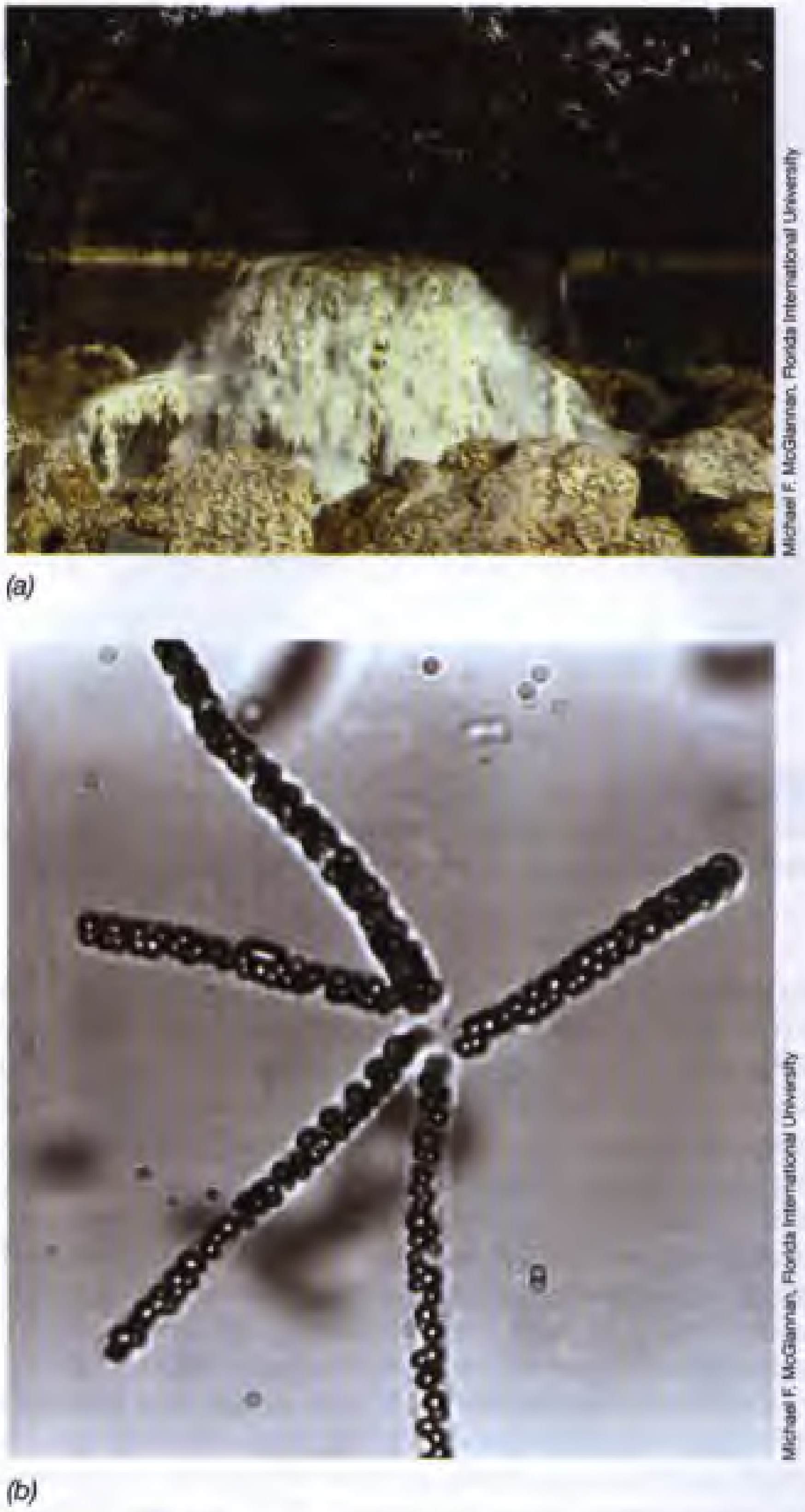
Figura 12.12 Células de una gran *Thioploca* marina. Las células contienen gránulos de azufre (amarillo) y miden unos 40-50 µm de ancho.

puestos de organismos como las *Zoogleas* (*véase* Sección 28.2). Este fenómeno conocido como «barros engrosados» impide que el procesamiento de las aguas residuales se desarrolle apropiadamente, ya que las aguas que se vierten son todavía muy ricas en materia orgánica; por ejemplo, en el tratamiento de las aguas residuales, la formación de «barros engrosados» se produce cuando *Beggiatoa* u otras bacterias filamentosas llega a remplazar por completo a *Zooglea* en el proceso de activación de los fangos (*véase* Sección 28.2).

Thioploca y *Thiothrix*

Otras bacterias filamentosas que oxidan azufre incluyen especies de los géneros *Thioploca* y *Thiothrix*. *Thioploca* constituye un filamento muy largo, quimiolitotrofo y oxidante del azufre que da lugar a agrupaciones rodeadas por una única vaina (Figura 12.12). En el suelo oceánico de las costas de Chile y Perú, se han encontrado tapetes gruesos de especies marinas de *Thioploca*. Estudios sobre la ecología de estos organismos han demostrado que llevan a cabo la oxidación anóxica del H_2S acoplada a la reducción de nitrato (NO_3^-), presumiblemente hasta N_2 (desnitrificación) (*véanse* Secciones 17.14 y 19.12). No deja de ser interesante que las células de *Thioploca* pueden acumular cantidades ingentes de nitrato intracelularmente y que este nitrato puede mantenerlas vivas durante periodos muy largos de tiempo, respirándolo anaeróbicamente utilizando H_2S como donador de electrones. Se postula que estas formas marinas de *Thioploca* fijan cantidades sustanciales de CO_2 y que también tienen una función muy importante en los ciclos del azufre y del nitrógeno. Tapetes similares constituidos principalmente de *Beggiatoa* se encuentran cerca de las fuentes hidrotermales submarinas (*véase* Sección 19.8), pero en estos casos la conexión con la respiración del nitrato no está tan bien establecida.

Thiothrix es un organismo filamentoso que oxida azufre en el que se agrupan varios filamentos por un extremo formando rosetas (Figura 12.13). Fisiológicamente *Thiothirx* es un mixotrofo aerobio estricto y, en este sentido, así como en otros aspectos, se asemeja a *Beggiatoa*.



Michael F. McGlannan, Florida International University

Michael F. McGlannan, Florida International University

Figura 12.13 *Thiothrix*. (a) Un pozo artesiano azufrado en Florida (USA). La parte externa del manantial está cubierta por un tapete *Thiothrix*. (b) Micrografía de contraste de fases de una roseta de *Thiothrix* creciendo en cultivo axénico. Nótense los glóbulos internos de azufre producidos por la oxidación del sulfuro.

12.5 *Bacteria* oxidantes del hidrógeno

Géneros clave

Ralstonia
Alcaligenes

Existe una gran variedad de bacterias capaces de crecer con H_2 como único donador de electrones y de O_2 como aceptor de electrones según la reacción siguiente:

$$H_2 + \tfrac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O \qquad \Delta G^{0\prime} = -237 \text{ kJ}$$

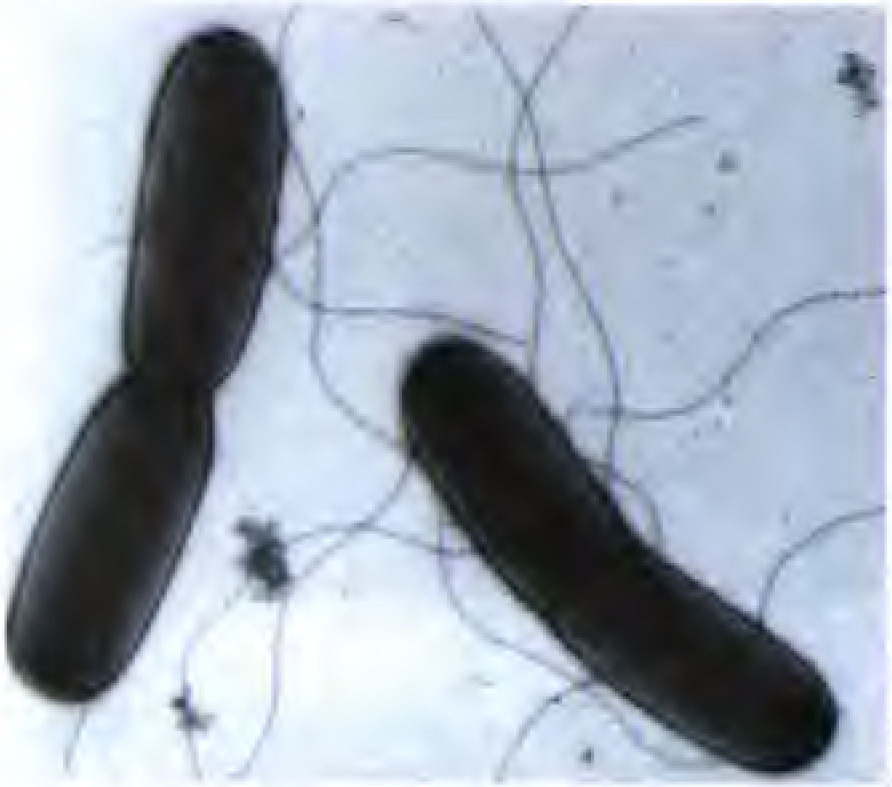

Frank Mayer

Figura 12.14 Micrografía electrónica de transmisión de una tinción negativa del quimiolitotrofo oxidante de hidrógeno *Ralstonia eutrophus*. Diámetro celular de 0,6 µm con varios flagelos.

Sin embargo, no todas ellas pueden crecer autotróficamente (utilizando las reacciones del ciclo de Calvin para incorporar el CO_2) y se las agrupa en esta obra como *bacterias quimiolitotrofas oxidantes de hidrógeno*. Se conocen bacterias oxidantes de hidrógeno tanto Gram positivas como Gram negativas, siendo las mejor estudiadas las incluidas en los géneros *Ralstonia* (Figura 12.14), *Pseudomonas*, *Paracoccus* y *Alcaligenes* (Tabla 12.6). Todas las bacterias oxidantes de hidrógeno contienen una o más *hidrogenasas* que funcionan uniendo H_2 y lo usan para producir ATP o para producir poder reductor para el crecimiento autotrófico.

Casi todas las bacterias de este grupo son *quimiolitotrofos facultativos*, lo que quiere decir que también pueden crecer quimioorganotróficamente utilizando compuestos orgánicos como fuente de energía. Ésta es una distinción importante entre los quimiolitotrofos del hidrógeno y muchos de los quimiolitotrofos del azufre o nitrificantes; la mayoría de los representantes de los dos últimos grupos son *quimiolitotrofos estrictos*, en los que el crecimiento no tiene lugar en ausencia de fuente de energía inorgánica. Por el contrario, los quimiolitotrofos del hidrógeno pueden cambiar alternativamente de un metabolismo quimiolitotrófico a un metabolismo quimioorganotrófico y viceversa, según las condiciones nutricionales del ambiente en la naturaleza.

Fisiología y ecología de *Bacteria* del hidrógeno

La mayoría de las bacterias del hidrógeno crecen mejor en condiciones de microaerofilia cuando lo hacen quimiolitotróficamente sobre el H_2, ya que las hidrogenasas son enzimas sensibles al oxígeno. Típicamente, los niveles de oxígeno que mejor soportan el crecimiento están entre 5-10%. El níquel también debe estar presente ya que, virtualmente, todas las hidrogenasas lo contienen como cofactor. Algunas bacterias del hidrógeno también pueden fijar N_2, y cuando lo hacen son muy sensibles al oxígeno ya que la nitrogenasa necesaria para la reducción del nitrógeno molecular (Sección 17.28) es una enzima muy sensible al oxígeno.

Las bacterias que oxidan hidrógeno son enriquecibles si se inoculan medios minerales que contengan trazas de Ni^{2+} y de Fe^{2+} con suelo o agua y se incuban en un matraz grande sellado que contenga como gas de cabeza un 5% de O_2, 10% de CO_2 y un 85% de H_2. Cuando el líquido se vuelve turbio, se deben sembrar varias placas con el mismo medio y la misma mezcla de gases (la manipulación de estos gases debe realizarse con cuidado ya que la mezcla de H_2 y de O_2 es potencialmente explosiva).

La oxidación de CO

Algunas *Bacteria* del hidrógeno pueden crecer sobre monóxido de carbono, CO, como fuente de energía entrando los electrones resultantes de la oxidación de CO hasta CO_2 en la cadena de trasporte de electrones empleada en la génesis de ATP. Las bacterias que oxidan CO y que se denominan *carboxidotróficas* crecen autotróficamente utilizando las reacciones del ciclo de Calvin para fijar el CO_2 generado por la oxidación del CO. La enzima implicada en esta reacción es la *deshidrogenasa de monóxido de carbono*, que es una proteína que contiene molibdeno. El molibdeno en la enzima está enlazado a un cofactor con varios anillos o *pterina*, de una manera similar a como lo hace la nitrato reductasa (*véase* Sección 17.14).

El consumo de CO por bacterias carboxidotróficas es ecológicamente importante. Aunque genera mucho CO por actividades humanas y otras fuentes, su cantidad en la atmósfera no ha aumentado significativamente en muchos años y, probablemente se deba a la proliferación de este grupo de bacterias. La liberación más significativa de CO al ambiente (escapes de motores de combustión, combustión incompleta de derivados del petróleo y de la lignina) ocurre en regiones ricas en oxígeno y es allí (capas superficiales del suelo) donde prosperan estas bacterias; por ello, seguramente las bacterias carboxidotróficas representan el principal sumidero de CO en la naturaleza. Algunas de las bacterias carboxidotróficas mejor estudiadas incluyen *Pseudomonas carboxidovorans*, *Bacillus schlegelii* y *Alcaligenes carboxydus* (Tabla 12.6). Al menos una bacteria carboxidotrófica puede crecer en CO y anaeróbicamente utilizando el nitrato como aceptor de electrones, pero no se trata de una propiedad muy típica dentro de este grupo. Como las bacterias del hidrógeno, virtualmente todos los aislados de las carboxidotróficas pueden crecer quimioorganotróficamente sobre sustratos orgánicos así como sobre CO.

✓ 12.3-12.5 Revisión de conceptos

Los quimiolitotrofos son procariotas que pueden oxidar donadores de electrones inorgánicos y en muchos casos utilizar CO_2 como única fuente de carbono.

- ✓ Comparar y contrastar las bacterias nitrificantes con las bacterias del azufre, del hierro y del hidrógeno, en términos de

TABLA 12.6 Características diferenciales de las especies de bacterias oxidantes de hidrógeno

Género y/o especie	Desnitrificación	Crecimiento en fructosa	Movilidad	Grupo filogenético[a]	DNA (GC mol %)	Otras características
Gram negativas						
Acidovorax facilus	−	+	+	Beta	64	Hidrogenasa unida a membrana
Ralstonia eutropha[a]	+	+	+	Beta	66	Hidrogenasas unidas a membrana y citoplasmática
Alcaligenes xylosoxidans	−	+	+	Beta	—	Hidrogenasas unidas a membrana y citoplasmática
Aquaspirillum autotrophicum	−	−	+	Beta	61	Hidrogenasa unida a membrana
Pseudomonas carboxydovorans	−	−	+	Gamma	60	Hidrogenasa unida a membrana también oxida CO
Hydrogenophaga flava	−	+	+	Beta	67	Colonias amarillo brillante
Seliberia carboxydohydrogena	−	?	+	Alfa	58	También oxida CO
Paracoccus denitrificans	+	+	−	Alfa	66	Hidrogenasa unida a membrana; poderoso desnitrificador
Aquifex pyrophilus	+	−	+	Grupo Aquifex[b]	65	Hipertermófilo. Crece en microaerofilia o anaeróbicamente con NO_3^-), quimiolitotrofo estricto; también utiliza S^0 o $S_2O_3^{2-}$ como donador de electrones
Hydrogenobacter thermophilus	−	−	−	Grupo Aquifex[b]	37-46	Como *Aquifex* pero aerobio estricto
Gram positivas						
Bacillus schlegelii	−	−	+	Bajo GC Gram positiva[c]	66	Forma endosporas; termófilo; también utiliza CO o $S_2O_3^{2-}$ como donador de electrones
Arthrobacter sp.	−	+	−	Alto GC Gram positiva[d]	70	Hidrogenasa unida a membrana
Mycobacterium gordonae	−	?	−	Alto GC Gram positiva[e]	—	Ácido alcohol resistente. Colonias rojas o amarillas

[a] La mayoría de las bacterias aeróbicas del hidrógeno son Proteobacteria, excepto las indicadas.
[b] *Véase* Sección 12.37.
[c] *Véase* Sección 12.20.
[d] *Véase* Sección 12.22.
[e] *Véase* Sección 12.23.

los donadores de electrones inorgánicos utilizados, la E_0' de los donadores de electrones (*véase* Capítulo 17) y de sus hábitat.

✓ ¿Qué ruta está presente para la asimilación de CO_2 en la mayoría de los quimiolitotrofos?

12.6 Metanotrofos y metilotrofos

Géneros clave

Methylomonas
Methylobacter

El metano, CH_4, es muy abundante en la naturaleza. Se produce en ambientes anóxicos por acción metabólica de las arqueas metanobacterias (*véanse* Secciones 13.4 y 17.17) siendo el gas más importante de los lodos anóxicos, rumen e intestino de los mamíferos. También, el metano es el principal componente del gas natural así como en muchas formaciones de carbón. Es una molécula relativamente estable, pero un grupo de bacterias, las metanotrofas, lo oxidan utilizando el metano y algunos compuestos monocarbonados como donadores de electrones para la generación de energía y como únicas fuentes de carbono. Estas bacterias, al contrario que las metanogénicas, son aerobias y están muy distribuidas en la naturaleza, en el suelo y en el agua. Presentan morfologías diversas y están todas ellas relacionadas filogenéticamente.

El metabolismo C_1

Además del metano existen otros compuestos monocarbonados utilizables por estos microorganismos. Una lista de los más importantes se recoge en la Tabla 12.7. Desde el punto de vista bioquímico, estos compuestos comparten

TABLA 12.7 Sustratos utilizados por las bacterias metilotrofas[a]

Sustratos utilizados para el crecimiento	Sustratos oxidados utilizados para el crecimiento (co-metabolismo)
Metano, CH_4[b]	Amonio, NH_4^+
Metanol, CH_3OH	Etileno, $H_2C{=}CH_2$
Metilamina, CH_3NH_2	Clorometano, CH_3Cl
Dimetilamina, $(CH_3)_2NH$	Bromometano, CH_3Br
Trimetilamina, $(CH_3)_3N$	Hidrocarbonos superiores (etano, propano)
Tetrametilamonio, $(CH_3)_4N^+$	
Trimetil-óxido de nitrógeno, $(CH_3)_3NO$	
Trimetilsulfonio, $(CH_3)_3S^+$	
Formato, $HCOO^-$	
Formamida, $HCONH_2$	
Monóxido de carbono, CO	
Dimetil éter, $(CH_3)_2O$	
Dimetil carbonato, $CH_3OCOOCH_3$	
Dimetilsulfóxido, $(CH_3)_2SO$	
Sulfuro de dimetilo, $(CH_3)_2S$	

[a] Un único aislado no utiliza todos los compuestos listados, pero al menos se ha descrito una bacteria metilotrófica que oxida cada uno de los compuestos que se recogen aquí.

[b] Los metilotrofos que son capaces de oxidar el metano se denominan *metanotrofos*.

una característica clave: *no contienen enlaces carbono-carbono*. Por esta razón todos los enlaces celulares de este tipo deben sintetizarse *de novo*. Estos organismos que utilizan compuestos de un átomo de carbono se denominan **metilotrofos**. Muchos, pero no todos, son también metanotrofos. Así pues, los metanotrofos son organismos únicos, en el sentido de que pueden crecer sobre compuestos monocarbonados muy oxidados *y también* sobre metano, que es la forma más reducida del carbono. Los metanotrofos poseen una enzima específica, la *monooxigenasa de metano*, para introducir un átomo de oxígeno en la molécula de metano, lo que conduce a la formación de metanol (*véase* Sección 17.24). El requerimiento de O_2 como reactante en la oxigenación inicial del metano explica, por tanto, el porqué los metanotrofos son aerobios estrictos. Todos los metanotrofos son también *estrictos* en la utilización de compuestos C_1 no pudiendo utilizar compuestos carbonados en los que existan enlaces carbono-carbono. Por el contrario, muchos metilotrofos no metanotrofos pueden utilizar ácidos orgánicos, etanol y azúcares.

Las bacterias oxidantes de metano son únicas entre los procariotas en el sentido de que poseen relativamente elevadas concentraciones de esteroles. Como se indicó en la Sección 4.5, los esteroles se encuentran en los eucariotas formando parte de los sistemas membranosos, pero están ausentes en la mayoría de los procariotas. En los metanotrofos, los esteroles pueden ser una parte importante del sistema membranoso interno (*véase* más tarde), implicado en la oxidación del metano.

Clasificación de los metanotrofos

La Tabla 12.8 recoge la clasificación de los metanotrofos. Inicialmente estas bacterias fueron identificadas sobre la base de su morfología y de sus formas de resistencia, pero pronto se vio que podían dividirse en dos grupos más amplios por el tipo de formaciones membranosas que poseían y la forma de asimilar el carbón. El Tipo I asimila los compuestos de un carbono por la ruta de la **ribulosa monofosfato**, mientras que el tipo II lo hace por la ruta de la **serina**. En la Sección 17.24, se discuten los detalles bioquímicos de estas rutas. Ambos grupos de metanotrofos contienen sistemas membranosos muy desarrollados que parece están relacionadas con la capacidad de oxidar el metano. Los me-

TABLA 12.8 Algunas características de las bacterias metanotróficas

Organismo	Morfología	Grupo 16S rRNA[a]	Forma de resistencia	Membranas internas: Tipo[b]	Ciclo del ácido cítrico[c]	Ruta de asimilación carbono[d]	Fijación del N_2	DNA (GC mol %)
Methylomonas	Bacilo	Gamma	Cuerpos tipo cistes	I	Incompleta	Ribulosa monofosfato	No	50-54
Methylomicrobium	Bacilo	Gamma	Ninguno	I	Incompleta	Ribulosa monofosfato	No	49-60
Methylobacter	De coco a cocobacilo	Gamma	Cuerpos tipo cistes	I	Incompleta	Ribulosa monofosfato	No	50-54
Methylococcus	Coco	Gamma	Cuerpos tipo cistes	I	Incompleta	Ribulosa monofosfato	Sí	62-64
Methylosinus	Bacilo o vibriode	Alfa	Exospora	II	Completa	Serina	Sí	63
Methylocystis	Bacilo	Alfa	Exospora	II	Completa	Serina	Sí	63
Methylocella[e]	Bacilo	Alfa	Exospora	II	—	Serina	Sí	61

[a] Todas son Proteobacterias.

[b] Membranas internas: Tipo I, grupos de membranas en forma de disco, vesiculares y distribuidas por todo el organismo; Tipo II, pares de membranas a lo largo de la periferia de la célula. *Véase* Figura 12.15

[c] Los organismos con el ciclo del ácido cítrico incompleto carecen de la enzima α-cetoglutarato deshidrogenasa y, por tanto, no pueden oxidar el acetato hasta CO_2.

[d] *Véanse* Figuras 17.59 y 17.60. A diferencia de otros metilotrofos, las especies de *Methylococcus* contienen las enzimas del ciclo de Calvin.

[e] Acidófilos, pH óptimo de crecimiento a 5.

tanotrofos Tipo I se caracterizan por poseer estas membranas de tipo disco distribuidas por toda la célula (Figura 12.15*b*), mientras que las de Tipo II las poseen alrededor de la periferia de la célula (Figura 12.15*a*). Los metanotrofos de Tipo I también se caracterizan por carecer de un ciclo completo de ácido cítrico (no poseen el enzima *α-cetoglutarato deshidrogenasa*), mientras que las de Tipo II lo poseen completo. La ausencia de este ciclo funcional (*véase* Figura 5.22) disminuye notablemente la capacidad de estos organismos para crecer quimioorganotróficamente. Si estas reacciones cíclicas no tienen lugar, entonces no se puede generar NADH, lo que en suma previene el crecimiento a expensas de compuestos orgánicos metabolizados, por lo general, a través del ciclo del ácido cítrico.

Ecología y aislamiento

Los metanotrofos están ampliamente distribuidos en medios acuáticos y terrestres, detectándose siempre que exista una fuente estable de metano. El metano formado en zonas anóxicas de los lagos sube con la columna de agua y muchas veces los metanotrofos se concentran en la estrecha franja que representa la termoclina en la que el metano de las zonas anóxicas se encuentra con el oxígeno de la zona oxigenada. Por este motivo las bacterias que oxidan metano juegan un papel importante en el ciclo del carbono, convirtiendo el metano, que se deriva de la descomposición de materia orgánica en zonas anaerobias, en nuevo material celular (y CO_2).

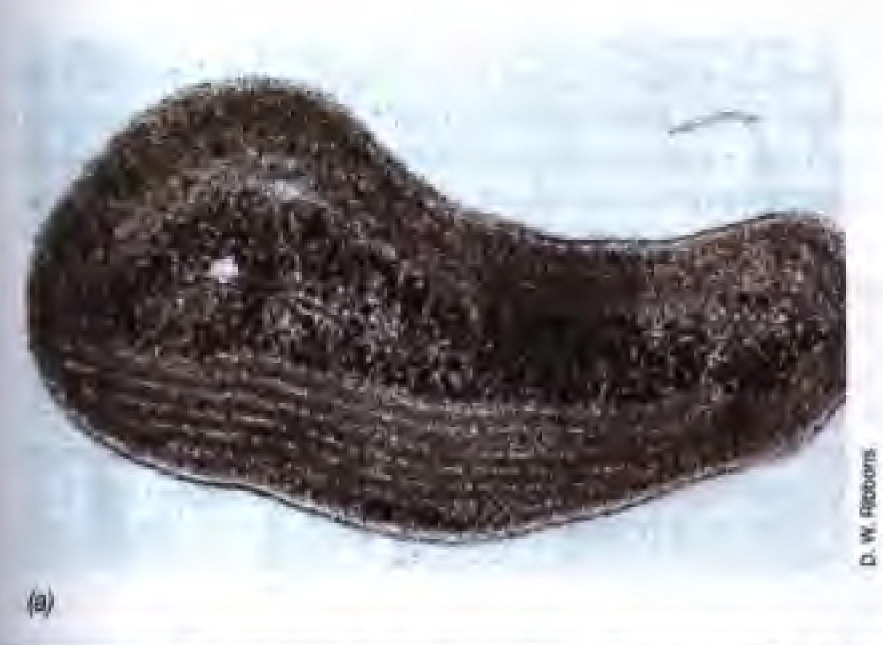
Para el enriquecimiento de las bacterias metanotróficas todo lo que se necesita es un medio de sales minerales y una atmósfera de metano al 80% y al 20% de aire. Una vez que se consigue buen crecimiento, el aislamiento en cultivo puro se obtiene estriando repetidas veces en placas con medio con sales minerales, que se incuban en atmósfera con la atmósfera antes mencionada. Las colonias que aparecen en la superficie del agar son de dos tipos: organotrofos comunes, que crecen a expensas de trazas de material orgánico y que aparecen alrededor de 1-2 días, y en segundo lugar los metanotrofos, que aparecen después de una semana. Las colonias de los metanotrofos son rosas debido a la producción de varios pigmentos carotenoídicos y este carácter puede ayudar a su aislamiento.

Los metanotrofos y las *Bacteria* formadoras de nitroso

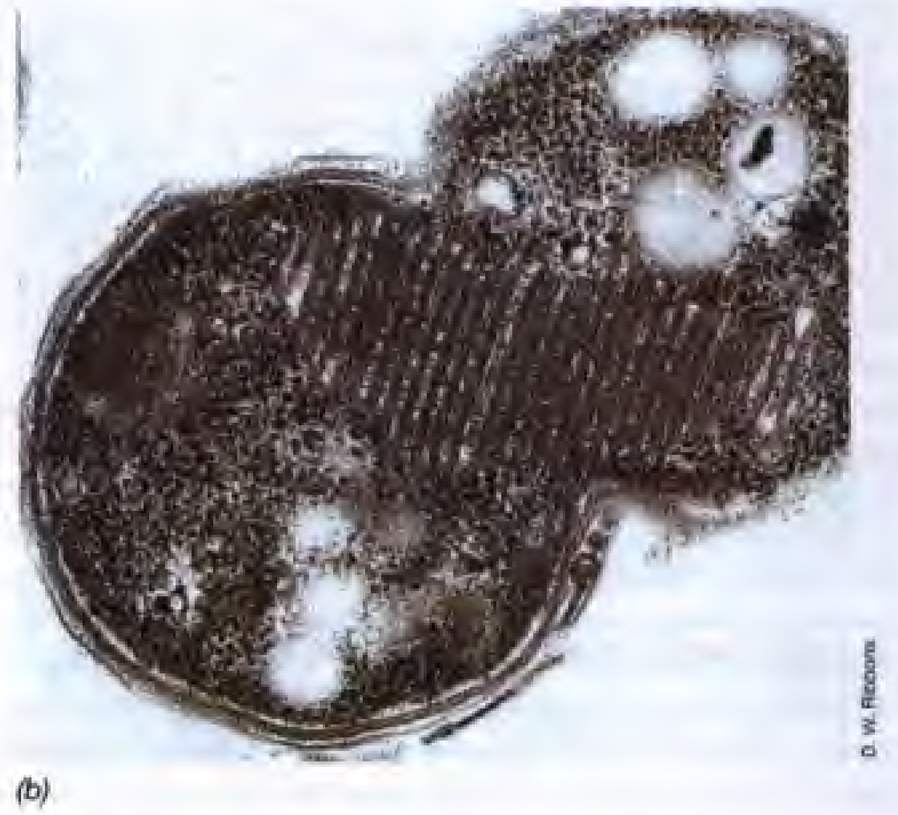
Las bacterias metanotróficas son capaces de oxidar amoníaco, aunque no pueden crecer quimiolitotróficamente utilizando el amonio como donador exclusivo de electrones. Además de la oxidación de metano, la monooxigenasa de metano también funciona para oxidar amonio y de hecho existe una relación competitiva entre ambos sustratos. Por esa razón, el amoníaco es tóxico para los metanotrofos, de tal manera que la fuente preferida de nitrógeno es el nitrato. Se ha especulado con la posibilidad de que las bacterias metanotróficas hayan evolucionado a partir de bacterias quimiolitotrofas formadoras de nitroso a través de mutaciones que convirtieron a la monooxigenasa de amonio en monooxigenasa de metano. El hecho de que ambos grupos de bacterias hayan elaborado membranas internas (*véase* Sección 12.3) y de que estén filogenéticamente relacionadas apoyan esta teoría. Además, las bacterias metanotróficas contienen algunos genes que dirigen la síntesis de las mismas proteínas que en las bacterias metanogénicas, que filogenéticamente son *Archaea* (*véase* Sección 13.4). Veremos en las Secciones 17.17 y 17.24 el contraste de los procesos metanogénicos y metanotróficos.

Metanotrofos simbiontes de animales

Existen asociaciones simbióticas descritas en la bibliografía entre las bacterias metanotróficas y mejillones marinos así como ciertos tipos de esponjas. Los mejillones suelen vivir en la vecindad de aliviaderos de metano, que es liberado en cantidades apreciables. Tanto el animal entero como el tejido del aparato respiratorio del animal consumen elevadas cantidades de metano en presencia de O_2. En el tejido de las branquias del mejillón se encuentran bacterias cocáceas en



D. W. Ribbons



D. W. Ribbons

Figura 12.15 Micrografías electrónicas de metanotrofos. (a) Una especie de *Methylosinus* ilustrando el sistema membranoso tipo II. Diámetro celular de 0,6 µm. (b) *Methylococcus capsulatus* ilustrando el sistema membranoso tipo I. Diámetro celular de 1 µm.

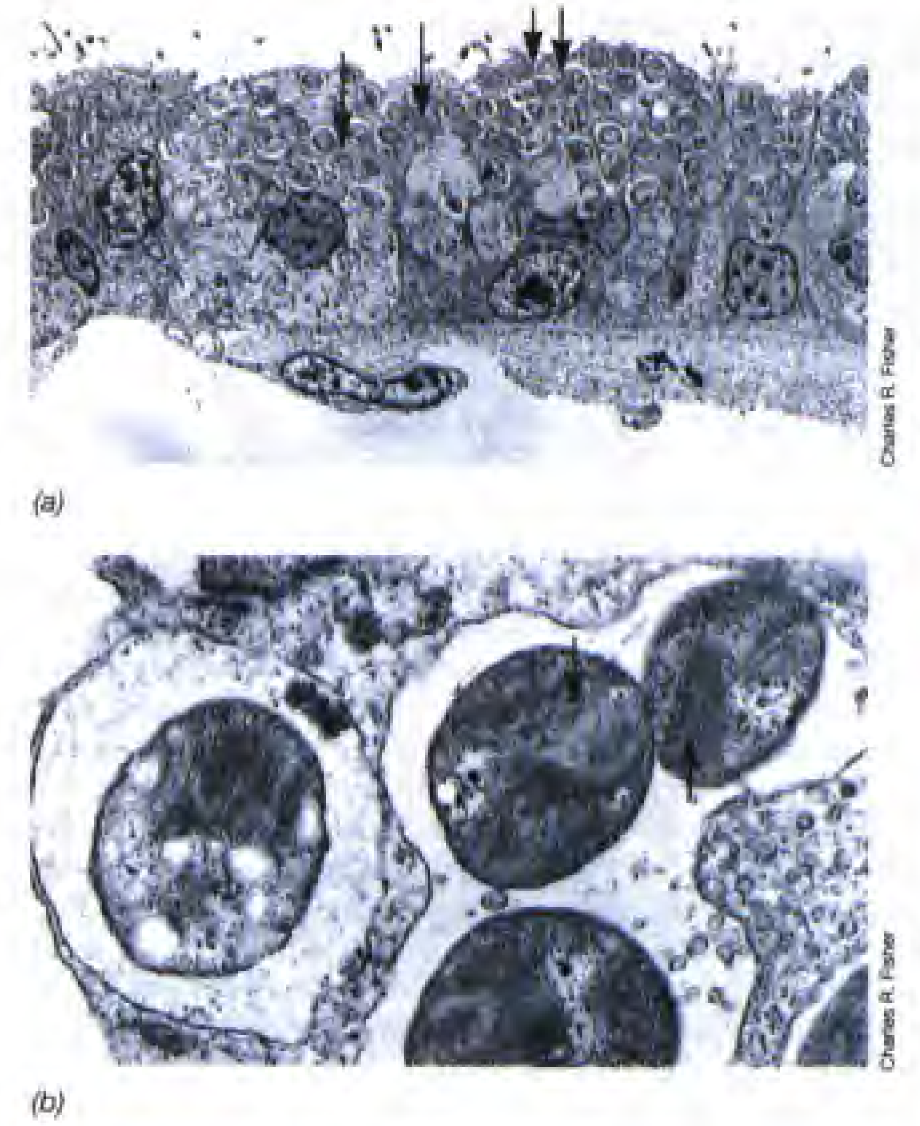


Figura 12.16 Simbiontes metanotrofos de mejillones marinos. (a) Corte fino de tejido respiratorio de un mejillón del Golfo de Méjico. Nótense los metanotrofos simbiontes (flechas) en el tejido. (b) Aumento de la sección anterior mostrando los metanotrofos de tipo I. Nótese los grupos de membranas (flechas). Diámetro celular de 1 μm.

gran número (Figura 12.16*a*) que contienen paquetes de membranas intracitoplasmáticas (Figura 12.16*b*) del tipo I, semejantes a las de las bacterias metanotróficas. Estas bacterias se ubican en vacuolas intracelularmente y cerca de la superficie de las agallas para asegurar un buen intercambio de gases. Presumiblemente, el metano asimilado por los metanotrofos se distribuye en los animales por la excreción de moléculas carbonadas a cargo de las bacterias metanotrofas. Este tipo de simbiosis metanotrófica es, por tanto, conceptualmente semejante a la simbiosis que se establece entre los quimiolitotrofos que oxidan sulfuro, los gusanos de tubo que se localizan en sulfataras submarinas y las almejas gigantes discutidas en la Sección 19.00. La simbiosis animal-bacteria, tal como la del mejillón metanotrófico/esponja y la de las sulfataras submarinas, muestran claramente que las células procarióticas pueden ocasionalmente constituir la base de una cadena alimenticia de un solo escalón.

✓ 12.6 Revisión de conceptos

Los metilotrofos son procariotas capaces de crecer sobre compuestos carbonados que carecen de enlaces carbono-carbono. Algunos metilotrofos son también metanotrofos, capaces de crecer en CH_4. Se conocen dos clases de metanotrofos poseyendo cada uno sus peculiaridades bioquímicas y estructurales. Los metanotrofos se encuentran en el agua y suelo, y pueden ubicarse también como simbiontes de moluscos.

✓ ¿Cuál es la diferencia entre un *metanotrofo* y un *metilotrofo*?

✓ ¿Qué características diferencian al Tipo I del Tipo II en los metanotrofos?

✓ ¿Qué clase de animales tienen simbiontes metanotróficos y de dónde viene el metano que necesitan los simbiontes?

12.7 *Pseudomonas* y grupo de las pseudomonas

Géneros clave

Pseudomonas
Burkholderia
Zymomonas
Xanthomonas

Todos los géneros de este grupo son bacilos rectos o ligeramente incurvados, Gram negativos, aerobios y quimioorganotrofos con flagelos polares (Figura 12.17*b*). Los géneros importantes son *Pseudomonas, Commamonas, Ralstonia* y *Burkholderia*, que se describen con cierto detalle aquí. Otros géneros incluyen *Xanthomonas*, un patógeno primario de plantas causantes de un sinnúmero de lesiones necróticas. Sus especies se caracterizan por poseer color amarillo; *Zooglea* caracterizado por la formación de entramados fibrilares extracelulares, lo que causa que las células se agreguen y floculen (este organismo es el componente principal de los *fangos activados*; Sección 28.2) y *Gluconobacter* cuyas especies se caracterizan por llevar a cabo la oxidación incompleta de azúcares o alcoholes hasta ácidos, tales como la oxidación de glucosa hasta ácido glucónico o de etanol hasta ácido acético (este organismo se discute brevemente junto con otras bacterias del ácido acético en la Sección 12.8). Filogenéticamente, los géneros comprendidos en las pseudomonadales se distribuyen entre las Proteobacterias (*véase* Tabla 12.1).

Características de las pseudomonas

Las características distintivas de las pseudomonas se recogen en la Tabla 12.9. De igual manera, también se recogen las características mínimas requeridas para identificar un organismo como una pseudomona. Las características identificativas clave incluyen ausencia de gas a partir de la glucosa y oxidasa positiva; características que son muy útiles para diferenciarlas de las bacterias entéricas (*véase* Sección 12.11).

Las especies del género *Pseudomonas* se definen sobre la base de su filogenia y de varias características fisiológicas, como se esquematiza en las Tablas 12.10 y 12.11. Las pseudomonas tienen requerimientos nutritivos muy simples y crecen quimioorganotróficamente a pH neutro en un ran-

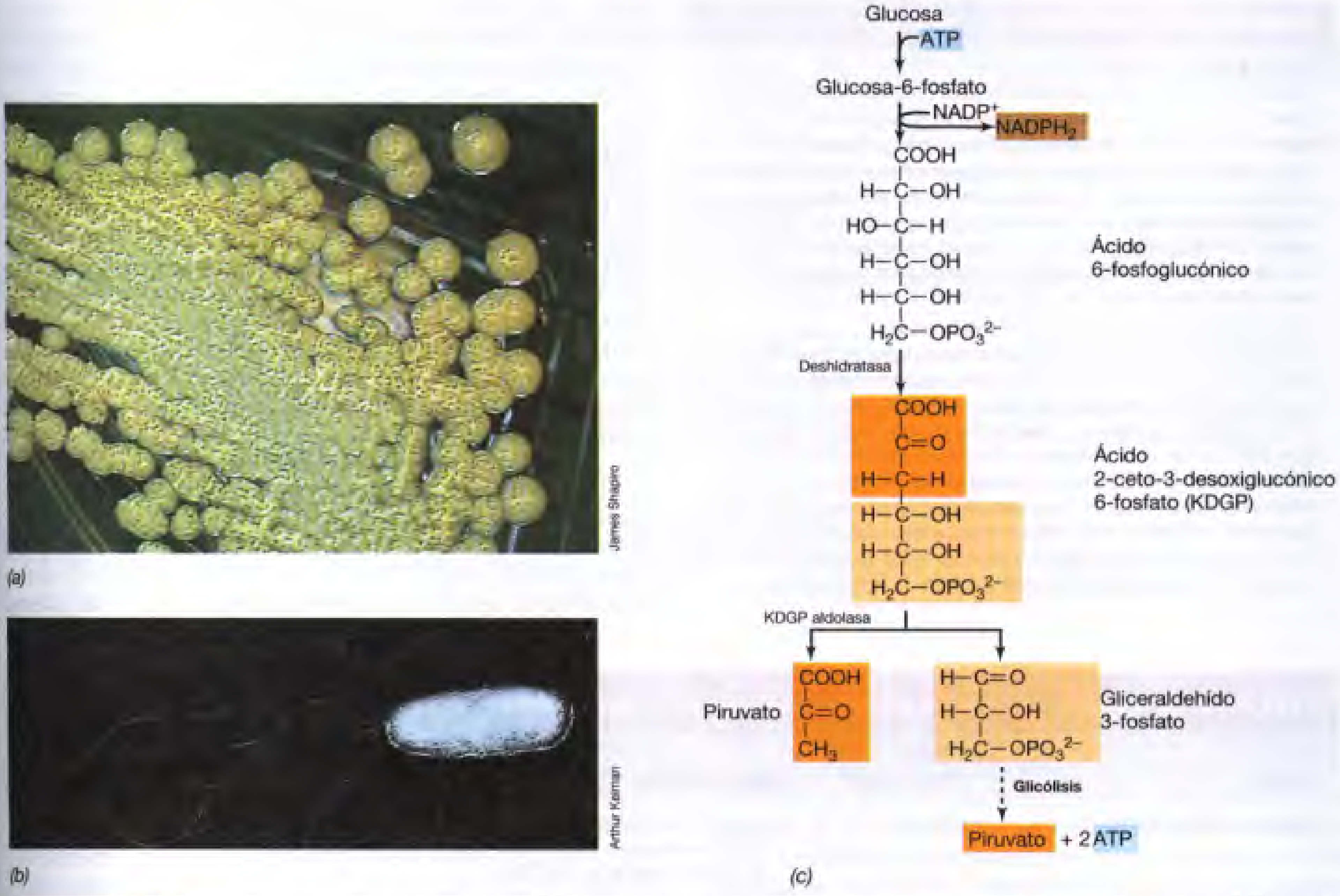

James Shapiro
(a)
Arthur Kelman
(b)
Glucosa
ATP
Glucosa-6-fosfato
NADP+
NADPH2
COOH
H–C–OH
HO–C–H
H–C–OH
H–C–OH
H2C–OPO3 2–
Ácido
6-fosfoglucónico
Deshidratasa
COOH
C=O
H–C–H
H–C–OH
H–C–OH
H2C–OPO3 2–
Ácido
2-ceto-3-desoxiglucónico
6-fosfato (KDGP)
KDGP aldolasa
Piruvato
COOH
C=O
CH3
H–C=O
H–C–OH
H2C–OPO3 2–
Gliceraldehído
3-fosfato
Glicólisis
Piruvato
+ 2ATP
(c)

Figura 12.17 Colonias típicas de *Pseudomonas*, morfología celular y ruta bioquímica comunes de todas las pseudomonas. (a) Colonias de *Burkholderia cepacia* en agar. (b) Preparación al microscopio electrónico de transmisión con sombreado metálico de una especie de *Pseudomonas*. Diámetro celular de 1 µm. (c) Ruta de Entner-Doudoroff, ruta principal de catabolismo de la glucosa en todas las pseudomonas.

go mesofílico de temperaturas. Una de las características que más llaman la atención de las pseudomonas, es el amplio abanico de compuestos que pueden utilizar como fuentes de carbono y energía. Algunas de las especies utilizan más de *100* compuestos y solamente unas pocas especies utilizan menos de 20. Como ejemplo de esta gran diversidad una simple cepa de *Burkholderia cepacia*, puede utilizar diferentes azúcares, ácidos grasos, ácidos dicarboxílicos y tricarboxílicos, alcoholes, polialcoholes, glicoles, compuestos aromáticos, aminoácidos más una mezcla de compuestos orgánicos que no se encuadran en ninguna de las categorías anteriores. Por el contrario, las pseudomonas carecen generalmente de los enzimas hidrolíticos necesarios para degradar los polímeros en sus monómeros. Nutricionalmente muy versátiles las pseudomonas contienen típicamente una pléyade de operones inducibles (*véase* Sección 8.5). Debido a que el catabolismo de los sustratos orgánicos pero habituales, a menudo, precisan la actividad de varias enzimas diferentes, las pseudomonas son ecológicamente muy significativas en el suelo y agua y probablemente los responsables de la degradación de muchos compuestos solubles que se derivan de la ruptura monomérica de materiales de plantas y animales en hábitat oxigenados.

Muchas pseudomonas, así como otras muchas bacterias Gram negativas, metabolizan la glucosa vía Entner-Doudoroff (Figura 12.17*c*). Dos de las enzimas clave de esta ruta, a saber: *6-fosfogluconato deshidrogenasa* y *2-ceto-3-desoxiglucosafosfato aldolasa* (Figura 12.17*c*) se encuentran no solamente en especies de los géneros *Pseudomona* sino también de *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Zymononas* y otras bacterias Gram negativas; por el contrario están sistemáticamente ausentes de *Bacteria* Gram positivas en las que se ha realizado un muestreo.

Pseudomonas patógenas

Ciertas especies del género *Pseudomonas* son patógenas (Tabla 12.11).Entre las pseudomonas fluorescentes la especie *Pseudomona aeruginosa* está frecuentemente asociada a infecciones de los tractos respiratorio y urinario en humanos. Las infecciones por *Pseudomona aeruginosa* son frecuentes en grandes quemados u otros traumatismos severos que afecten a amplias zonas de la piel o bien en pacientes con fibrosis quística. Sin embargo, no es un parásito estricto, sino un oportunista típico, iniciando una

TABLA 12.9 Características de las pseudomonas

Características generales:
Bacilos rectos o curvados pero no vibrioides; tamaño de 0,5-1,0 μm por 1,5-4,0 μm; sin esporas; Gram negativas; flagelos polares, normalmente aislados; no envainadas apendiculadas o con yemas; metabolismo respiratorio, nunca fermentativo, aunque pueden producir ligeras cantidades de ácido a partir de la glucosa en aerobiosis; utilizan compuestos orgánicos de bajo peso molecular pero no polímeros; algunos son quimiolitotrofos, utilizando H_2 o CO como único donador de electrones; algunos pueden utilizar nitrato como aceptor de electrones en anaerobiosis; algunos pueden usar arginina anaeróbicamente.

Características mínimas para la identificación:
Gram negativas, bacilos rectos o ligeramente curvados, sin esporas, siempre móviles por flagelos polares; metabolismo oxidativo; en medio para oxidación-fermentación con glucosa, el tubo sin vaselina produce ácido (amarillo) y el tubo con vaselina no produce ácido (color neutro); no se produce gas de la glucosa (se distinguen fácilmente de las bacterias entéricas y de *Aeromona*); la oxidasa es casi siempre positiva (las entéricas son negativas); la catalasa es siempre positiva; no presentan pigmentos fotosintéticos (lo distingue de las bacterias rojas no del azufre); el indol y el rojo de metilo son siempre negativos(para la discusión de muchas de estas pruebas bioquímicas *véase* la Sección 24.2).

infección cuando el individuo se encuentra bajo de defensas. También pueden causar infecciones sistémicas, de nuevo en individuos con amplias lesiones de piel. Este microorganismo es naturalmente resistente a muchos de los antibióticos utilizados rutinariamente de modo que la quimioterapia es difícil. Frecuentemente la resistencia se debe a la transferencia de plásmidos R (*véanse* Secciones 10.8 y 20.12) que es un plásmido que lleva genes para la destoxificación de diversos antibióticos. *P. aeruginosa* se aísla fundamentalmente en medios hospitalarios y puede infectar muy fácilmente a los pacientes que están en tratamiento por otras causas (*véase* Sección 25.7). La polimixina, un antibiótico poco utilizado en la terapia humana debido a su toxicidad, es sin embargo efectivo frente a *P. aeruginosa* y puede utilizarse con precaución por los severos efectos laterales.

Ciertas especies de *Pseudomona*, *Ralstonia* y *Burkholderia* y el género *Xanthomonas* son patógenas de plantas (fitopatógenos) (*véase* Tabla 12.11). En muchos casos estos organismos están tan adaptados al ambiente de las plantas que es difícil aislarlo de otros ambientes, incluido el suelo. Los fitopatógenos normalmente habitan en plantas que no

TABLA 12.10 Caracteristicas de los subgrupos y especies de los géneros *Pseudomona,Commamona, Ralstonia, y Burkholderia*

Grupo	Grupo filogenético[a]	Características	DNA (GC mol %)
Subgrupo fluorescente	Gamma	**La mayoría producen pigmentos fluorescentes verde-amarillento solubles en agua; no forman poli-β-hidroxibutirato; único grupo de homología de DNA**	
Pseudomonas aeruginosa		Producen piocianina, crecen hasta 43°C, flagelo polar único, desnitrificantes	67
Pseudomonas fluorescens		No producen piocianina y no crecen a 43°C; penacho de flagelos polares	59-61
Pseudomonas putida		Semejante a *P. fluorescens* pero no licuan la gelatina y crece en benzilamina	60-63
Pseudomonas syringae		Carece de arginina dihidrolasa, oxidasa negativo, patógeno para las plantas	58-60
Pseudomonas stutzeri		Saprofito del suelo, fuerte desnitrificador y no fluorescente	62
Subgrupo acidovorans	Beta	**No pigmentados, forman poli-β-hidroxibutirato, penacho de flagelos polares no utilizan carbohidratos; único grupo de homología de DNA**	
Commamonas acidovorans		Utiliza ácido mucónico como única fuente de carbono y donador de electrones	67
Commamonas testosteroni		Utiliza testosterona como única fuente de carbono	62
Subgrupo pseudomallei-cepacia	Beta	**Sin pigmentos fluorescentes, penacho de flagelos polares, forman poli-β-hidroxibutirato; único grupo de homología de DNA**	62
Burkholderia cepacia		Extremada versatilidad nutricional; algunas cepas son patógenas para plantas	67
Burkholderia pseudomallei		Causa melioidosis en animales; nutricionalmente versátiles	69
Burkholderia mallei		Causa el muermo en animales; inmóviles; nutricionalmente exigentes	69
Subgrupo diminuta-vesiculares	Alfa	**Flagelo único; requieren vitaminas (pantotenato, biotina, B_{12})**	
Pseudomonas diminuta		No pigmentada, no utiliza azúcares como fuente de carbono	66-67
Pseudomonas vesicularis		Con pigmentos carotenoides, utilizan azúcares	66
Subgrupo Ralstonia	Beta		
Ralstonia solanacearum		Patógeno de plantas	66-68
Ralstonia saccharophila		Crece quimiolitotróficamente con H_2, digieren almidón	69
Pseudomonas maltophilia		Requiere metionina, no utiliza NO_3^- como fuente de N oxidasa negativa	67

[a] Todas las pseudomonas son miembros de *Proteobacteria* (*Véase* Tabla 12.1)

TABLA 12.11 Especies patógenas de *Pseudomona, Burkholderia* y *Xanthomona*

Especie	Relación con la enfermedad
Patógenos de animales	
P. aeruginosa	Patógeno oportunista; especialmente en medios hospitalarios; en pacientes con problemas tumorales, metabólicos o hematológicos; infecciones nosocomiales derivadas de cateterismos, traqueotomías, punciones lumbares y transfusiones; pacientes con tratamientos prolongados con inmunosupresores, corticosteroides, antibióticos radiaciones; puede contaminar heridas quirúrgicas, abscesos, quemaduras, infecciones de oído, pulmones de pacientes tratados con antibióticos, fibrosis quística; principalmente un organismo del suelo.
P. fluorescens	Raramente patógeno, ya que no crece bien a 37°C; puede crecer en sangre contaminada y productos hematológicos refrigerados.
P. maltophilia	Organismo ubicuo de vida libre siendo un patógeno nosocomial habitual.
B. cepacia	Causa la podredumbre del bulbo de la cebolla; también se ha aislado de humanos y de ambientes médicos.
B. pseudomallei	Causa la melioidosis, una enfermedad común a hombres y animales en Asia.
B. mallei	Causa el muermo, una enfermedad de caballos que ocasionalmente se transmite al hombre.
P. stutzeri	A menudo aislado de humanos y muestras ambientales pudiendo vivir saprofíticamente en el cuerpo.
Patógenos de plantas	
R. solanacearum	Patógeno de muchas plantas cultivadas (patatas, tomates, tabaco, cacahuetes, etc.).
P. syringae	Ataca a las hojas produciendo clorosis y lesiones necróticas; raramente en el suelo.
P. marginalis	Causa podredumbres blandas de varias especies vegetales al ser un organismo muy pectinolítico.
X. campestris	Produce lesiones necróticas en hojas, tallos y frutos; raramente se encuentran libres en el suelo.

les sirven de hospedadoras, en las que los síntomas son muy poco aparentes, y desde allí son transmitidas a la planta hospedadora donde comienza la infección real. Los síntomas de las enfermedades son muy variadas, dependiendo tanto del fitopatógeno como de la planta; pero normalmente se debe a la liberación por parte de la bacteria de toxinas, enzimas líticos, factores de crecimiento celular y otras sustancias que destruyen el tejido, o al menos, lo distorsionan. En muchos casos, los síntomas tienen un elevado valor diagnóstico. Así, *Pseudomonas syringae* se suele aislar de hojas con lesiones cloróticas (amarilleo), mientras que *P. marginales* es un típico fitopatógeno que produce «podredumbre blanda» de los tallos o tubos germinativos, pero muy raramente de las hojas.

Zymomonas

El género *Zymomonas* es Gram negativo, de bacilos muy grandes que fermenta vigorosamente los azúcares hasta etanol. Aunque es estrictamente fermentativo, el género *Zymomonas* tiene relación filogenético con las pseudomonas y tiene activa la ruta de Entner-Doudoroff (Figura 12.17*c*). *Zymomonas* es el organismo habitual implicado en procesos fermentativos a partir de plantas en muchas áreas de América Central y del Sur, así como en África y Asia y, de hecho, es tan importante en el campo de las fermentaciones como lo es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en Europa y Norteamérica. *Zymomonas* está implicado en la fermentación del *pulque* en México y de la bebida de palma en muchas áreas tropicales, así como de la caña de azúcar y de la miel. Aunque *Zymomonas* es raramente el único organismo implicado en estas fermentaciones, sí suele ser el dominante y, probablemente, es el responsable de la producción de la mayor parte del etanol en estas bebidas. *Zymomonas* es también el responsable del deterioro de bebidas tales como la sidra o la cerveza.

Zymomonas se distingue de *Pseudomonas* por su metabolismo fermentativo, microaerofilia, ser oxidasa negativa y otras características taxonómicas de índole molecular. También se parece a las bacterias del ácido acético (*véase* Sección 12.8) y de, hecho, es frecuente aislarlo junto con ellas. Este hecho tiene interés ya que *Zymomonas*, como las levaduras, fermentan la glucosa hasta etanol y las bacterias del ácido acético lo oxidan hasta ácido acético. Probablemente este grupo de bacterias depende de la actividad de las levaduras y de *Zymomonas* para la producción del sustrato sin el que no pueden vivir, el etanol. Al contrario que las levaduras que utilizan la ruta glucolítica de Embden-Meyerhoff, *Zymomonas* utiliza, como es típico en este grupo, la de Entner-Doudoroff.

12.8 *Bacteria* del ácido acético

Géneros clave

Acetobacter
Gluconobacter

Las bacterias del ácido acético forman un grupo de bacilos Gram negativos, aeróbicos, que llevan a cabo la oxidación *incompleta* de alcoholes y de azúcares, lo que conduce a la acumulación de ácidos orgánicos como productos finales. Con etanol como sustrato, se produce ácido acético, de aquí el nombre trivial de este grupo bacteriano. Otra propiedad es su alta resistencia a condiciones acídicas, ya que la mayoría de las cepas pueden crecer a pH inferior de 5. Esta tolerancia al ácido resulta esencial para que un organismo produzca grandes cantidades de ácido. Las bacterias del ácido acético son un conjunto heterogéno, que comprende organismos con flagelos, polares y perítricos. Los organismos con flagelos polares se incluyen en el género *Gluconobacter*, mientras que los organismos con flagelos peritricos lo hacen en el grupo *Acetobacter*. Todas las bacterias del ácido acético conocidas se agrupan filogenéticamente con las alfa Proteobacteria (*véase* Tabla 12.1).

Además de la flagelación, *Acetobacter* difiere de *Gluconobacter* en que es superoxidante, es decir, es capaz de oxidar el ácido acético hasta CO_2. Esta peculiaridad está relacionada con la presencia de un ciclo del ácido cítrico completo y funcional. *Gluconobacter* carece de un ciclo del ácido cítrico completo por lo que es incapaz de oxidar el ácido cítrico, mientras que *Acetobacter* tiene todas las enzimas del ciclo y puede oxidarlo.

Ecología y usos industriales

Las bacterias del ácido acético se encuentran frecuentemente asociadas a bebidas alcohólicas tales como la sidra, el vino o la cerveza. Las colonias de este grupo se reconocen en placas de agar con $CaCO_3$ y etanol, ya que estas bacterias, debido al ácido acético producido, disuelven el $CaCO_3$ generando así una zona transparente alrededor de la colonia, claramente distinguible frente a la opacidad de esta sal (Figura 12.18). Estas bacterias se utilizan en la producción comercial del vinagre. (*véase* Sección 30.10).

Además del etanol, estos organismos llevan a cabo la oxidación incompleta de alcoholes de cadena larga y varios azúcares. Así por ejemplo, la glucosa es oxidada hasta ácido glucónico, la galactosa hasta galactónico, la arabinosa hasta arabónico y así sucesivamente. Esta capacidad «suboxidante» se utiliza precisamente para la manufactura de ácido ascórbico (vitamina C). El ácido ascórbico puede formarse a partir de la sorbosa, pero este azúcar es difícil de sintetizar químicamente y puede generarse convenientemente por la actividad de las bacterias acéticas que oxidan el sorbitol (un alcohol de azúcar facilmente disponible) solo hasta sorbosa, proceso llamado bioconversión (*véase* Sección 30.8).

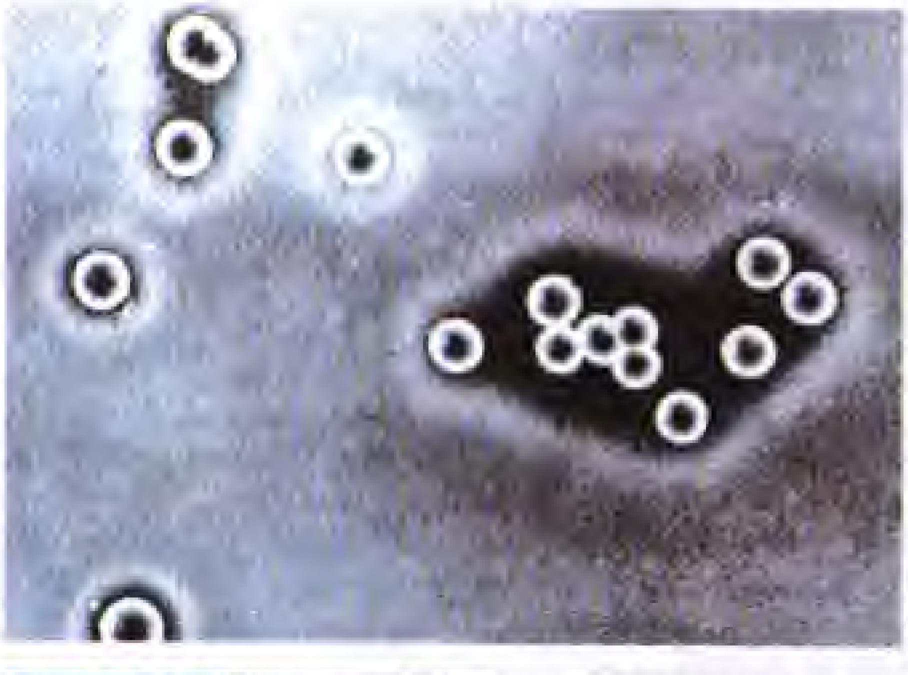

T. D. Brock

Figura 12.18 Colonias de *Acetobacter aceti* en placas de agar con etanol como fuente de energía y carbonato cálcico. Nótese la zona clara alrededor de las colonias debido a la disolución del carbonato cálcico por el ácido acético producido por las bacterias.

Otra propiedad interesante de algunas bacterias acéticas es su capacidad de sintetizar celulosa. Esta celulosa no difiere significativamente de la de las plantas, con la excepción de que es pura y no mezclada con hemicelulosas, pectinas o ligninas, formando un entramado de microfibrillas donde se reproducen estas bacterias. Si se crecen en un matraz sin agitación originan una película superficial de celulosa con las bacterias. Ya que estas bacterias son aerobias estrictos, la capacidad para formar tal película superficial puede representar el medio que este organismo utiliza para quedarse en la superficie y asegurarse un suministro adecuado de oxígeno.

12.9 *Bacteria* aeróbicas de vida libre fijadoras de nitrógeno

Géneros clave

Azotobacter
zomonas

Existen varios tipos de microorganismos que habitan fundamentalmente en el suelo y tienen la capacidad de fijar nitrógeno aeróbicamente (Tabla 12.12). El género *Azotobacter* comprende un grupo de especies de bacilos grandes, Gram negativos, aerobios estrictos y fijadores de N_2 sin establecer simbiosis con plantas (Figura 12.19). La primera especie del género fue descubierta por el microbiólogo holandés M. W. Beijerinck a principios del siglo XX, utilizando cultivos de enriquecimiento aeróbicos con N_2 atmosférico como fuente de nitrógeno. La mayoría de estas bacterias son alfa o gamma *Proteobacteria*.

Taxonomía

Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre pertenecen a los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Beijerinckia*. Las células de *Azotobacter* son grandes (incluso igualando el tamaño de las levaduras), con diámetros de 2-4 μm o incluso más. El pleomorfismo es común en el grupo, habiéndose descrito una gran variedad de formas celulares. Algunas estirpes son móviles por flagelos peritricos. En medios con carbohidratos, se forman grandes cápsulas y capas mucoides (*véanse* Figura 12.20; Figura 17.71). A pesar de que *Azotobacter* es un aerobio estricto, su nitrogenasa (enzima que cataliza la fijación biológica del N_2) (*véase* Sección 17.28) es muy sensible al O_2. Se piensa que el material capsular y mucoide protegen a este enzima del efecto inactivante del O_2. *Azotobacter* es capaz de crecer también sobre una gran diversidad de carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos. En este caso, el metabolismo es estrictamente oxidativo y los productos de fermentación, habituales en bacterias fermentativas, muy raramente se detectan en este grupo bacteriano. Todos sus miembros fijan nitrógeno, pero pueden utilizar también formas combinadas simples tales como amoníaco, urea o nitrato.

Azotobacter tiene formas de resistencia denominadas *cistos*. Como las endosporas, los *cistos de Azotobacter* (Figura 12.19*b*) tienen un índice de respiración muy bajo y

TABLA 12.12 Géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre

Género	Número de especies	Grupo filogenético[a]	Características	DNA (GC mol %)
Azotobacter	9	Gamma	Bacilos grandes, producen cistos; se encuentran principalmente en suelos neutros alcalinos	63-67
Azomonas	3	Gamma	Bacilos grandes, sin cistos; principalmente acuáticos	52-59
Azospirillum	4	Alfa	Bacilos microaerofílicos; asociados con plantas	69-71
Beijerinckia	4	Alfa	Bacilo en forma de pera, con cuerpos lipídicos grandes en cada extremo; produce abundante material mucoide; habita en suelos ácidos	54-59
Derxia	1	Alfa	Bacilos, colonias rugosas	69-73

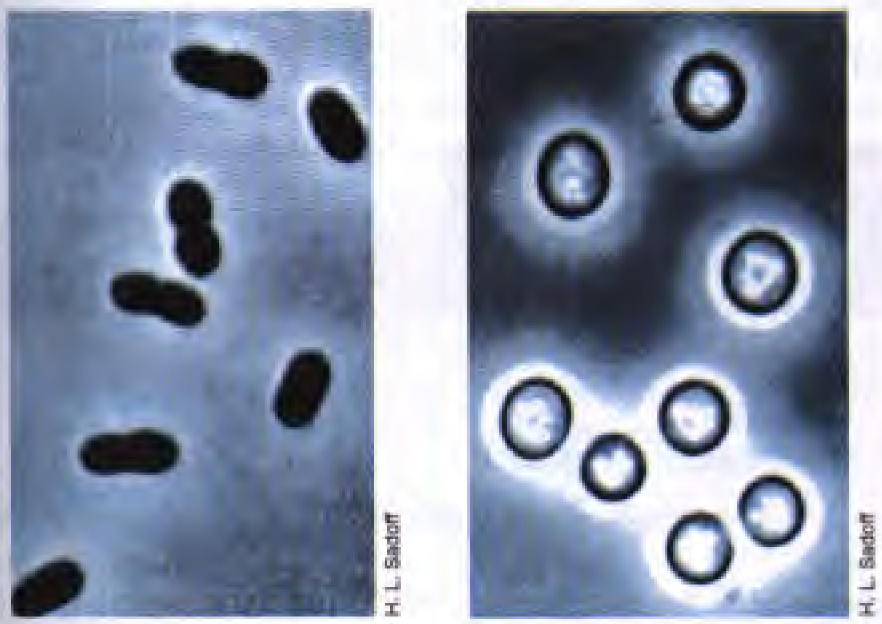
[a] Todas las especies son miembros de Proteobacteria (Figura 12.1).

son resistentes a la desecación, desintegración mecánica y radiaciones ultravioleta e ionizantes. Sin embargo, *no* son particularmente resistentes a la temperatura y no están completamente en reposo porque oxidan rápidamente fuentes exógenas de energía.

Los restantes géneros de este grupo incluyen *Azomonas*, un género muy semejante a *Azotobacter*, excepto que no forma cistos de resistencia y que son primariamente acuáticos, *Beijerinckia* y *Derxia* (Figura 12.21); dos géneros que crecen bien en suelos ácidos y *Azospirillum*, un espirilo fijador de nitrógeno que forma asociaciones simbióticas no específicas con diversas plantas y en concreto con el maíz.

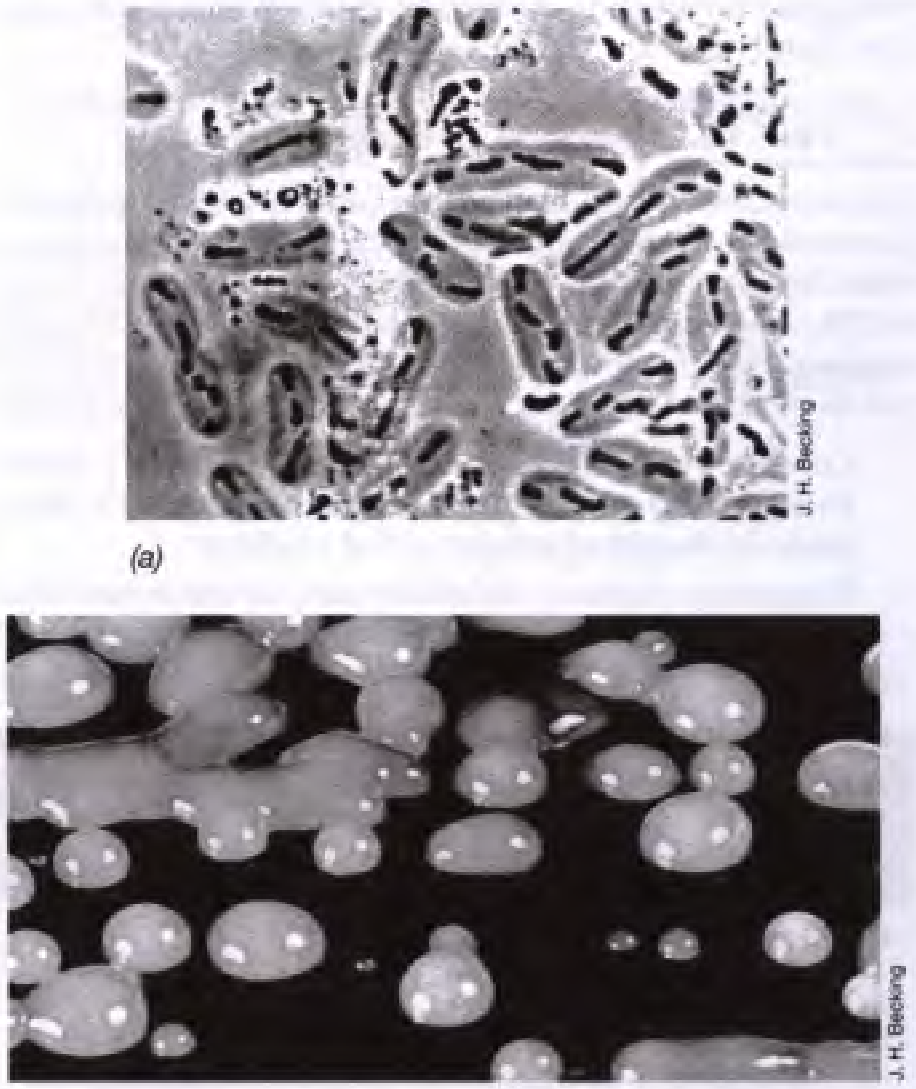
Azotobacter y nitrogrenasas alternativas

En la Sección 17.28 se estudiará el importante proceso de la fijación biológica del nitrógeno. Allí aprenderemos el papel crucial que juegan metales como el molibdeno (Mo) y hierro (Fe) en la nitrogenasa. La especie *Azotobacter chroococcum* fue la primera bacteria fijadora de nitrógeno en la que se demostró crecimiento sobre nitrógeno en ausencia de molibdeno. En *A. chroococcum*, se demostró que existían dos «nitrogenasas alternativas» con vanadio (V) o hierro (Fe) cuando crecían bajo ciertas condiciones de cultivo. Consecuentemente, las investigaciones con otras bacterias fijadoras de nitrógeno han demostrado la presencia siste-



(a) (b)

Figura 12.19 *Azotobacter vinelandii:* (a) células vegetativas y (b) cistos. Observación al microscopio de contraste de fases. Diámetro celular de 2 µm y el del cisto de 3 µm. Compárese con la Figura 1.14*b*.



(b)

Figura 12.20 Ejemplos de producción de mucosidad por bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno. (a) Células de *Derxia humosa* atrapadas en mucosidad. Las células poseen una anchura de 1-1,2 µm. (b) Colonias de *Beijerinckia* creciendo en medio con carbohidratos. Nótese la apariencia brillante y elevada de las colonias debido a la abundancia de material capsular.

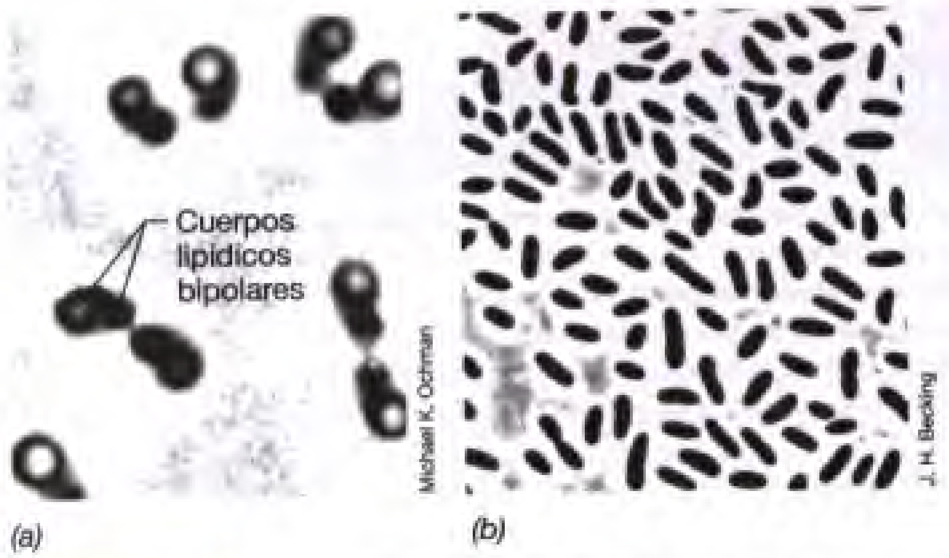


Figura 12.21 Micrografías de contraste de fases de dos géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno tolerantes al ácido. (a) *Beijerinckia indica*. Las células son periformes y de 0,8 μm de diámetro con un gran glóbulo de poli-*b*-hidroxibutirato (*véase* Sección 4.13) en cada extremo. (b) *Derxia humosa*, célula de 1 μm de diámetro.

mática de estas nitrogenasas de reserva, que funcionan solamente cuando el molibdeno no está presente, están ampliamente disribuidas entre las bacterias fijadoras de nitrógeno incluyendo *Archea*, en las que unas pocas especies fijan N_2.

✓ 12.7-12.9 Revisión de conceptos

Los pseudomonas incluyen bacilos Gram negativos quimioorganotrofos y aerobios; muchas especies fijadoras de nitrógeno están filogenéticamente relacionadas y pueden reducir N_2 hasta NH_3. Las bacterias acéticas son también un grupo filogenéticamente relacionado con las pseudomonas y se caracterizan por su capacidad de oxidar aeróbicamente etanol hasta acetato.

- ✓ Compare y contraste las pseudomonas, *Azotobacter* y las bacterias acéticas en términos de requerimiento de O_2, donadores de electrones, patogenicidad y hábitat.
- ✓ Compare y contraste *Acetobacter* con *Acetobacterium* (*véase* Sección 17.16) de tantas formas como crea oportuno.

12.10 Neisseria, Chromobacterium y géneros relacionados

Géneros clave

Neisseria
Chromobacterium

Este grupo de Proteobacterias beta y gamma comprende especies relacionadas filogenético y morfológicamente, así como por su reacción al Gram, (negativas), morfología, movilidad y metabolismo respiratorio. Los géneros *Neisseria, Moraxella, Branhamella Kingella* y *Acinetobacter* se recogen en la Tabla 12.13.

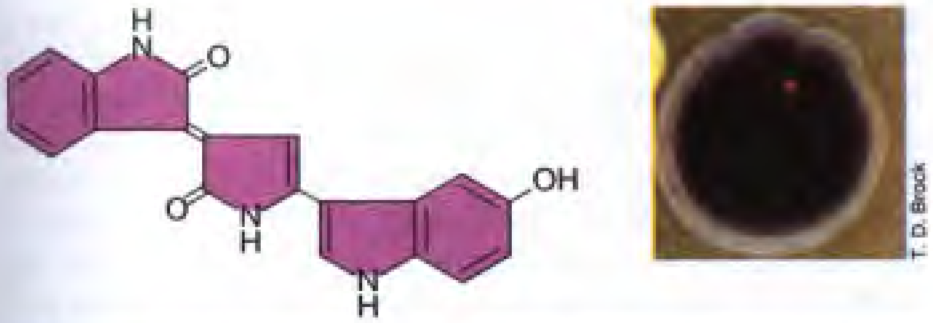
En el género *Neisseria*, las células son siempre cocáceas (Figura 26.28) mientras que en el resto de los géneros son bacilares haciéndose cocos solamente en la senectud, lo que ha llevado a que sean propuestas como **cocobacilos**. Las especies de los géneros *Neisseria, Kingella* y *Moraxella* se aíslan comúnmente de animales y algunas son patógenas, mientras que las especies de *Acinetobacter* son comunes en el suelo y aguas; ocasionalmente han sido descritos como nocosomiales en animales. Algunas cepas de *Moraxella* y *Acinetobacter* poseen la interesante propiedad de mobilidad por contracción (retorciendose) lo que se manifiesta como breves movimientos de translocación o «saltos» cubriendo distancias de 1-5 μm. Se discute el significado clínico de *N. gonorrhoeae* en la Sección 24.1 y 26.12.

Filogenéticamente *Chromobacterium* está próximo a *Neisseria* pero es un bacilo, pareciéndose a las pseudomonas y enterobacterias. La especie más estudiada es *C. violaceum*, un organismo de color violeta/púrpura ya que sintetiza un pigmento que se denomina violaceína (Figura 12.22), que se encuentra en suelos oxidando aguas y ocasionalmente en infecciones purulentas de humanos y otros animales. *Chromobacterium violaceum* y otras chromobacterias producen el pigmento púrpura o *violaceína* (Figura 12.22). La violaceína es un pigmento insoluble en agua que posee propiedades antibióticas y que solamente se produce en medios que contienen triptófano. *Chromobacterium* es un anaerobio facultativo que fermenta los azúcares y crece en aerobiosis oxidando diversas fuentes de carbono.

TABLA 12.13 Características de los géneros de cocos Gram negativos[a]

Características	Género	Número de especies	Grupo filogenético[a]	DNA (GC mol %)
I. Oxidasa positiva, sensibles a penicilina:				
Cocos; nutricionalmente complejos, utilizan carbohidratos y son aerobios estrictos	*Neisseria*	24	Beta	49-55
Bacilos o cocos, nutricionalmente simples, no utilizan carbohidratos; sin flagelos pero algunos con movilidad por flexión; muchos son comensales o patógenos para animales	*Moraxella*	8	Gamma	—
	Branhamella	10	Beta	40-47
	Kingella	2	Beta	47-55
II. Oxidasa negativa, resistentes a penicilina:				
Algunas cepas pueden utilizar un restringido rango de azúcares y tienen movilidad por contracción; saprofitos del suelo, agua y aguas residuales	*Acinetobacter*	7	Gamma	38-47

[a] Todas son Proteobacteria.



T. D. Brock

Figura 12.22 *Chromobacterium*. Una gran colonia de *Chromobacterium violaceum* en la parte derecha y estructura del pigmento violaceína producido por *C. violaceum*.

12.11 *Bacteria* entéricas

Géneros clave

Escherichia
Salmonella
Proteus
Enterobacter

Las **bacterias entéricas** comprenden un grupo relativamente homogéneo de Proteobacterias gamma, que se caracterizan fenotípicamente por lo siguiente: Gram negativos, bacilos no esporulados, no móviles o si lo son es por *flagelos de inserción peritrica* (Figura 12.23*a*), anaerobios facultativos, *oxidasa negativa*, con requerimientos nutricionales relativamente simples y fermentan azúcares con diversos productos finales. La característica fenotípica utilizada para separar las bacterias entéricas de otras semejantes por su fisiomorfología se indican en la Tabla 12.14.

Entre las bacterias entéricas se encuentran especies patógenas para el hombre, animales y plantas y también otras muy importantes desde el punto de vista industrial. Sin lugar a dudas se sabe más de la enterobacteria por excelencia *Escherichia coli* que de ninguna otra especie bacteriana (*véase* Sección 10.12).

Debido a la importancia médica de las bacterias entéricas, se han aislado y estudiado un sinnúmero de ellas y, a pesar de que existe una marcada relación genética entre muchas de las bacterias entéricas, como se observa por homologías de DNA y recombinación genética, se mantienen como géneros separados pricipalmente por razones prácticas. Dado que estos organismos se cultivan a partir de aislamientos clínicos, se requieren algunos métodos de identificación que faciliten el tratamiento de la enfermedad rápidamente, y por ello su características fenotípicas han sido tradicionalmente muy importantes para distinguir entre los géneros de las *Bacteria* entéricas.

Modelos de fermentación en las *Bacteria* entéricas

Una de las características llave para separar los diferentes géneros de bacterias entéricas es el tipo y la proporción de los productos de fermentación que se producen en condiciones anaerobias a partir de la glucosa. Se reconocen dos grandes modelos, la **fermentación ácido-mixta** y la **fermentación 2,3 butanodiólica** (Figura 12.24). En la primera, se forman tres

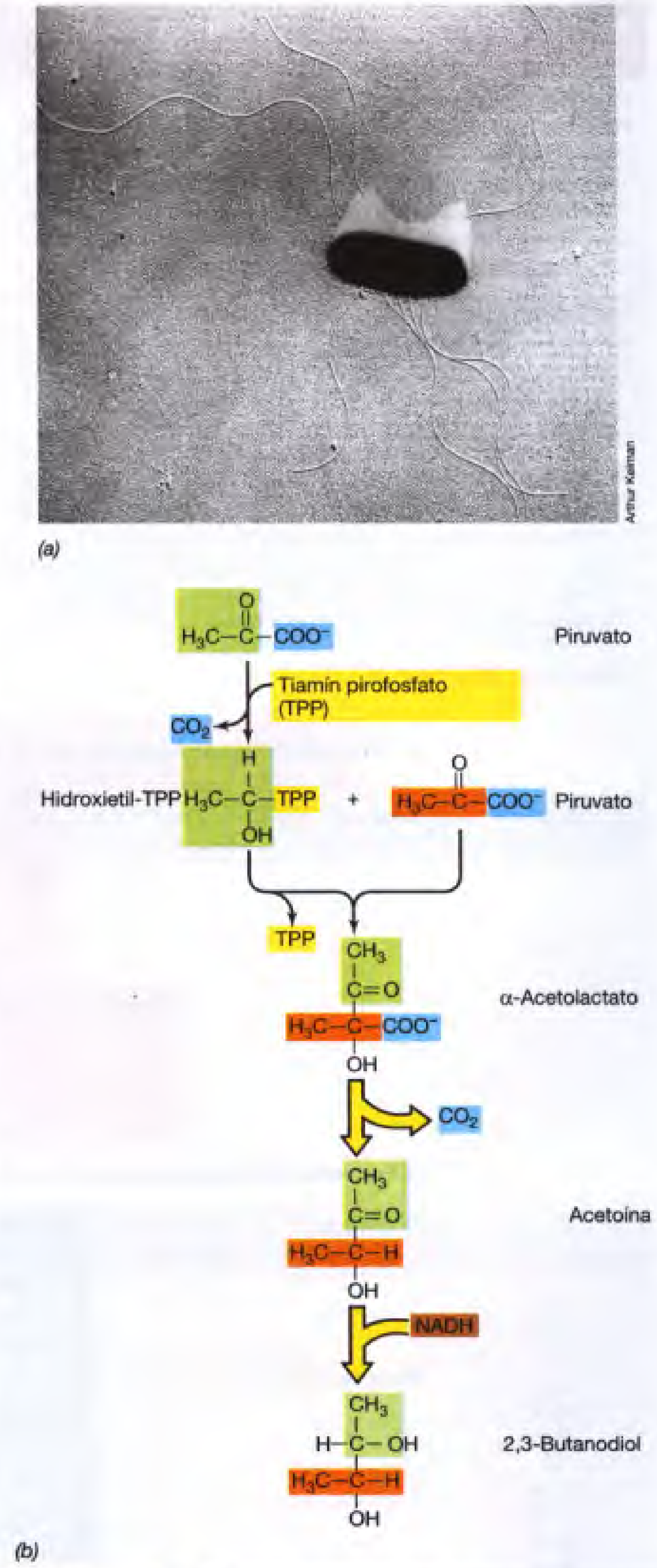


Figura 12.23 (a) Micrografía electrónica por sombreado metálico de la bacteria entérica productora de butanodiol *Erwinia carotovora*. Anchura celular de 0,8 µm. Nótese la flagelación peritrica (*véase* Sección 4.10). (b) Ruta bioquímica de formación de butanodiol a partir de dos moléculas de piruvato.

ácidos en cantidades significativas: ácido acético, láctico y succínico; se forman también etanol, CO_2 y H_2, pero *nunca* butanodiol. En la fermentación del butanodiol, se forman *pequeñas* cantidades de diversos ácidos siendo, con mucho, el 2,3 butanodiol, etanol, CO_2 y H_2 los productos principales. Como resultado de una fermentación ácido-mixta se producen cantidades equimoleculares de CO_2 y H_2, mientras que en el caso de una butanodiólica se produce mucho más CO_2 que H_2. Esto es así porque los fermentadores ácido-mixto producen CO_2 solamente a partir del ácido fórmico por medio del sistema enzimático *fórmico hidrógeno liasa*:

$$HCOOH \rightarrow H_2 + CO_2$$

Esta reacción produce cantidades iguales de CO_2 y de H_2. Los fermentadores del butanol producen el CO_2 y el H_2 a partir del ácido fórmico pero también dos moléculas adicionales de CO_2 por cada una de butanodiol (Figura 12.23*b*)

Existe una gran variedad de ensayos diagnósticos y medios diferenciales que pueden utilizarse para encuadrar una determinada enterobacteria en una de las dos grandes categorías reseñadas y se recogen con detalle en las Tablas 24.2 y 24.3. Sobre la base de estos y otros ensayos, los distintos géneros pueden definirse como se indica en las Tablas 12.15 y 12.16.

TABLA 12.14 Características definitorias de las bacterias entéricas

Características generales:

Bacilos rectos Gram negativos; móviles por flagelos peritricos o inmóviles; no espurulados; anaerobios facultativos, producen ácido de glucosa; el sodio ni es requerido para crecimiento ni lo estimula; catalasa positivo y oxidasa negativo y normalmente reducen nitrato a nitrito (nunca a N_2); 16S rRNA pertenecen a las gamma Protobacteria (*véase* Tabla 12.1)

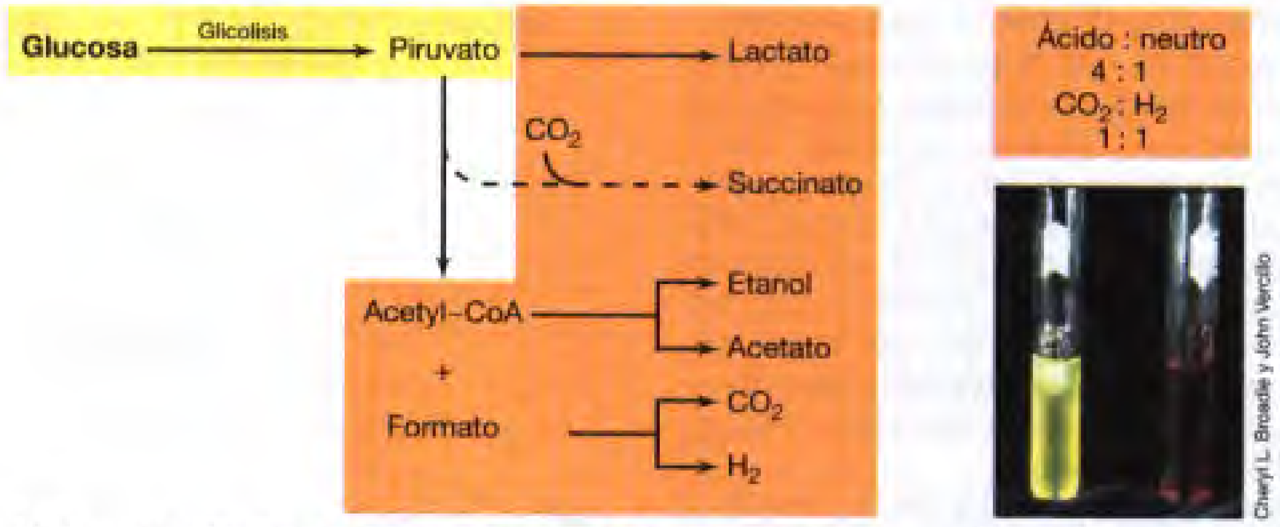
Pruebas clave para distinguir las bacterias entéricas de otras semejantes morfológicamente[a]:

Prueba de la oxidasa, ya que en las entéricas es siempre negativa. Separa las enterobacterias de bacterias oxidasa positivo de los géneros *Pseudomonas, Aeromonas, Vibrio, Alcaligenes, Achromobacter, Flavobacterium, Cardiobacterium*, que pueden tener morfología similar. El nitrato se reduce solo a nitrito (detección del nitrito después del cultivo) distingue las bacterias entéricas de otras que reducen el nitrato hasta N_2 (formación de gas) como es el caso de *Pseudomonas* y muchas otras bacterias oxidasa positiva; la capacidad de fermentar la glucosa distingue las bacterias entéricas de las bacterias aerobias estrictas.

---

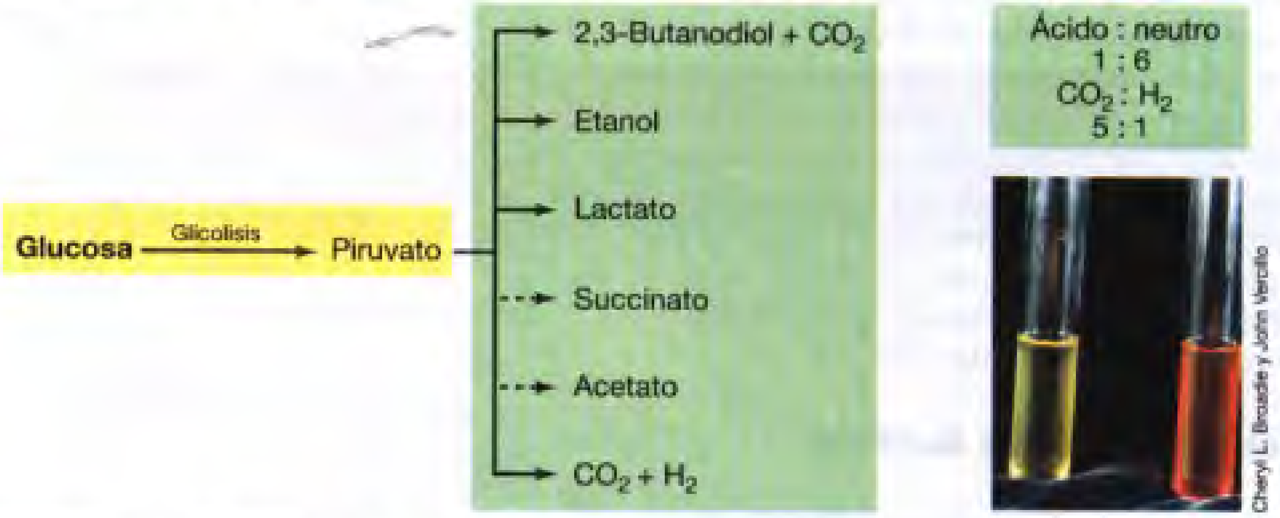
[a] *Véanse* Sección 24.2 y Figura 24.7.

(*a*) **Fermentación ácido mixta** (por ejemplo *Escherichia coli*) *Productos típicos* (moles)



Cheryl L. Broadie y John Vercillo

(*b*) **Fermentación butanodiólica** (por ejemplo *Enterobacter*) *Productos típicos* (moles)



Cheryl L. Broadie y John Vercillo

Figura 12.24 Diferenciación entre fermentación (a) ácido mixta y (b) butanodiólica en enterobacterias. Las flechas líneas continua representan las reacciones principales; las de línea discontinua reacciones secundarias. La foto superior muestra la producción de ácido (color amarillo) y gas (en el tubo invertido) en un cultivo de *E. Coli* (el tubo rojo no fue inoculado). La foto inferior representa una reacción positiva de Voges Proskauer (VP) de color rosáceo y que indica la producción de butanodiol en un cultivo de *Enterobacter aerogenes*. Se inoculó el tubo de la izquierda (amarillo). Nótese la principal diferencia en la producción de CO_2 en las dos rutas, la producción de butavodiol produce una cantidad de CO_2 sustancialmente mayor.

Debido a que las bacterias entéricas están genéticamente muy relacionadas, a veces su identificación alberga considerable dificultad. En los laboratorios clínicos, su identificación está basada frecuentemente en análisis computerizado utilizando una gran variedad de ensayos diagnósticos que utilizan pruebas miniaturizadas (kits) y sondas inmulológicas y de ácidos nucleicos (*véase* Figura 24.1) que tienen en cuenta la variación de las reacciones de cepas especiales. La separación de géneros que se indica en las Tablas 12.15 y 12.16 deben ser consideradas solo como aproximativas, porque siempre es posible aislar de la naturaleza una cepa que no posee determinada característica considerada obligada para el género. Con estas limitaciones *in mente* en la Figura 12.25 se propone una clave de separación todavía más simplificada. Esta clave permite una decisión rápida sobre en qué género se ha de ubicar un microorganismo que hayamos aislado recientemente. A continuación, se considerarán algunas propiedades de los géneros más representativos.

Escherichia, *Salmonella* y *Shigella*

Los miembros del género *Escherichia* son habitantes universales de todos los animales de sangre caliente, incluido el hombre, aunque no son, ni con mucho, los taxones dominantes en esos hábitatss. *Escherichia* puede tienen una función nutricional en el intestino sintetizando vitaminas y en especial vitamina K. Como anaerobio facultativo que es, probablemente también contribuye a la anaerobiosis del ambiente del intestino grueso. Las estirpes silvestres de *Escherichia* raramente tienen requerimientos nutricionales especiales, pudiendo crecer en una gran diversidad de compuestos carbonados tales como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y así sucesivamente. Algunas cepas son patógenas y han sido implicadas en el desarrollo de cuadros diarreicos en niños —a veces en proporciones epidémicas— en guarderías infantiles y en servicios ginecológicos y obstétricos. En personas de edad avanzada, es relativamente frecuente que ciertas estirpes de *Escherichia* causen infecciones de las vías urinarias o en aquellos pacientes que han sido tratados con radiaciones ionizantes. Estas cepas enteropatógenas de *E.coli* (EPEC) cada vez están más frecuentemente implicadas en infecciones cuasi-disentéricas y cuadros febriles agudos (*véanse* Secciones 21.6, 21.9 y 29.7). Como se indica allí, estas cepas forman *antígeno K*, que permite la colonización del intestino delgado y producción de una enterotoxina que es la responsable de los cuadros diarreicos.

TABLA 12.15 Reacciones diagnósticas claves, utilizadas para la separación de diversos géneros de bacterias entéricas[a]

Género	H_2S(TSI)	Ureasa[b]	VP	Indol	Movilidad	Gas a partir de glucosa[b]	β-Galactosidasa
Escherichia	−	−	−	+	+ o −	+	+
Enterobacter	−	−	+	−	+	+	+
Shigella	−	−	−	+ o −	−	−	+ o −
Edwardsiella	+	−	−	+	+	+	−
Salmonella	+	−	−	−	+	+	+ o −
Klebsiella	−	+	+ o −	−	−	+	+
Arizona	+	−	−	−	+	+	+
Citrobacter	+ o −	−	−	−	+	+	+
Proteus	+ o −	+	−	+ o −	+	+ o −	−
Providencia	−	−	−	+	+	−	−
Yersinia	−	+	−	−	+[c]	−	+
Hafnia	−	−	+	−	+	+	+ o −

Género	KCN	Citrato	Utilización de mucato	Rojo de metilo	Utilización de tartrato	Alanina desaminasa	DNA (GC mol %)
Escherichia	−	−	+	+	+	−	48-52
Enterobacter	+	+	+	−	−	−	52-60
Shigella	−	−	−	+	−	−	50
Edwardsiella	−	−	−	+ o −	−	−	53-59
Salmonella	−	+ o −	+ o −	+	+ o −	−	50-53
Klebsiella	+	+	+	−	+ o −	−	53-58
Arizona	−	+	+ o −	+	−	−	50
Citrobacter	+ o −	+	+	+	+	−	50-52
Proteus	+	+ o −	−	+	+	+	38-41
Providencia	+	+	−	+	+	+	39-42
Yersinia	−	−	−	+	−	−	46-50
Hafnia	+	+	−	+	−	−	48-49

[a] *Véase* Tabla 24.1 para los procedimientos de estas reacciones de diagnóstico.

[b] *Véase* Figura 12.24, foto de esta reacción.

[c] Móviles cuando crecen a temperatura ambiente; inmóviles a 37°C.

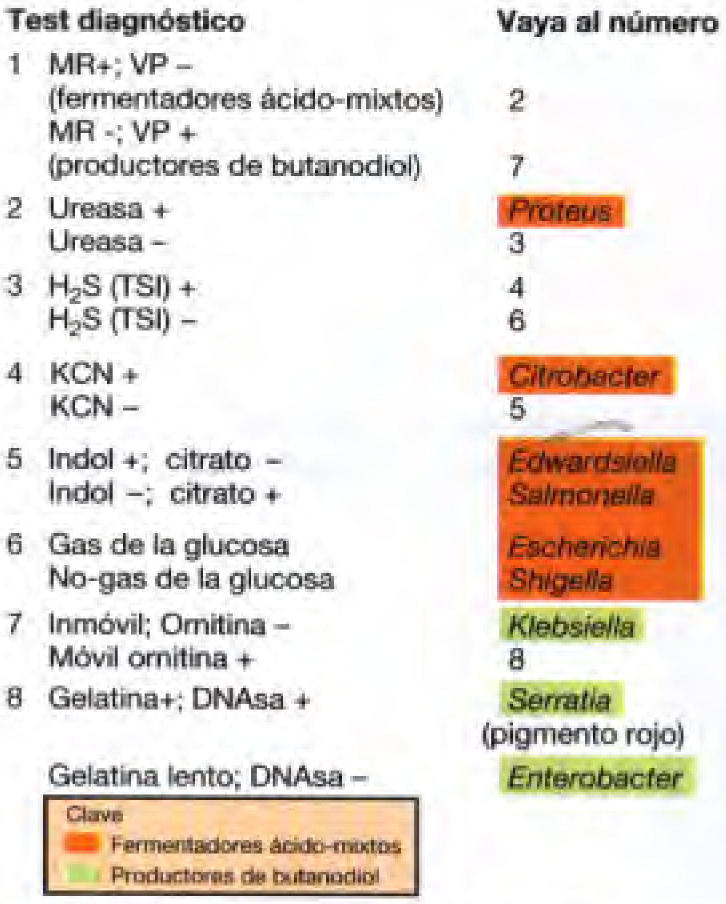
TABLA 12.16 Pruebas diagnósticas clave, utilizadas para separar varios géneros que producen 2.3 butanodial[a]

Género	Ornitina Descarboxilasa	Hidrólisis de gelatina	Temperatura óptima (°C)	Pigmentación	Movilidad	Lactosa	DNasa	Sorbitol	DNA (GC mol %)
Klebsiella	−	−	37-40	Ninguna	−	+	−	+	53-58
Enterobacter	+	Lento	37-40	Amarilla (o ninguna)	+	+	−	+	52-60
Serratia	+	+	37-40	Roja (o ninguna)	+	−	+	−	52-60
Erwinia[b]	−	+ 0 −	27-30	Amarilla (o ninguna)	+	+ 0 −	−	+	50-58
Hafnia	+	−	35	Ninguna	+	−	−	−	48-49

[a] *Véase* Tabla 24.3 para una descripción de estos ensayos diagnósticos.

[b] *Véase* Figura 12.23*a*.

Salmonella y *Escherichia* están bastante próximos; ambos géneros tienen un 50% de homología en su DNA, cuando se efectúa hibridación DNA: DNA (*véase* Sección 11.9). Sin embargo y en contraste con la mayoría de las escherichias, los miembros del género *Salmonella* son usualmente patógenos, bien para humanos o para otros animales de sangre caliente. En humanos, la enfermedad más común son las fiebres tifoideas y la gastroenteritis (*véanse* Secciones 28.8 y 29.6). Las salmonelas se caracterizan inmunológicamente sobre la base de tres antígenos superficiales, el antígeno O de pared celular (somático); el H, o flagelar y el Vi (capa externa polisacarídica) que se encuentra en las cepas causantes de las fiebres tifoideas. El antígeno O es parte del lipopolisacárido que constituye la capa más externa de la membrana externa de estos organismos (Sección 4.9 y 21.12). La estructura química del lipopolisacárido se indica en la Sección 4.9 (Figuras 4.35 y 4.36). El género *Salmonella* comprende más de 1000 serotipos que presentan diferencias antigénicas en sus antígenos O. Subdivisiones antigénicas adicionales se basan en los antígenos flagelares H. No hay correlación o es muy escasa, entre el tipo antigénico de una *Salmonella* y los síntomas de la enfermedad que producen, pero el tipado inmunológico permite el rastreo de una única cepa en brotes epidémicos.



Test diagnóstico	Vaya al número
1 MR+; VP − (fermentadores ácido-mixtos)	2
MR −; VP + (productores de butanodiol)	7
2 Ureasa +	*Proteus*
Ureasa −	3
3 H_2S (TSI) +	4
H_2S (TSI) −	6
4 KCN +	*Citrobacter*
KCN −	5
5 Indol +; citrato −	*Edwardsiella*
Indol −; citrato +	*Salmonella*
6 Gas de la glucosa	*Escherichia*
No-gas de la glucosa	*Shigella*
7 Inmóvil; Ornitina −	*Klebsiella*
Móvil ornitina +	8
8 Gelatina+; DNAsa +	*Serratia* (pigmento rojo)
Gelatina lento; DNAsa −	*Enterobacter*

Clave
🟧 Fermentadores ácido-mixtos
🟩 Productores de butanodiol

Figura 12.25 Una clave simplificada de los principales géneros de enterobacterias. Solamente se recogen los más comunes. Véase el texto para el uso de esta clave. Los ensayos diagnósticos se dan en la Tabla 24.3. En las Tablas 12.14-12.16 se indican otras características de los géneros. El código de colores es como en la Figura 12.24.

Las shigelas también están genéticamente relacionadas con *Escherichia*. Determinadas cepas de *Shigella* pueden presentar entre el 70 y el 100% de homología con *E.coli*. Al contrario que *Escherichia*, *Shigella* es patógeno primario para humanos, causando gastroenteritis muy severa que normalmente se conoce como *disentería bacilar*. *Shigella dysenteriae* se transmite por los alimentos y el agua, y es capaz de invadir el epitelio intestinal (*véase* Sección 29.10). Una vez establecido produce una endotoxina y una neurotoxina que presenta efectos enterotóxicos.

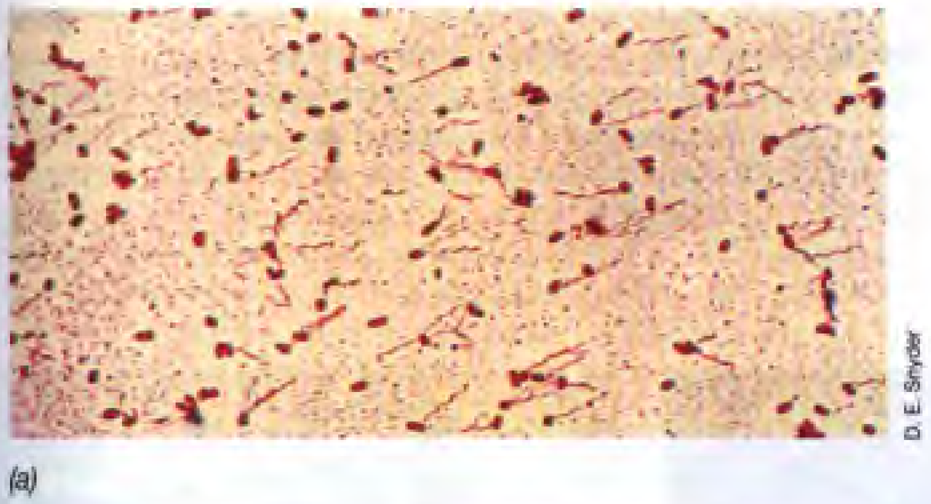
Proteus

El género *Proteus* se caracteriza por su rápida movilidad (Figura 12.26) y por la producción de ureasa. Por hibridación de DNA, solamente se encuentra una relación lejana con *Escherichia*. Frecuentemente, *Proteus* es la causa de infecciones urinarias en humanos y probablemente el hecho de ser ureasa positivo le facilita la colonización de ese econicho. A consecuencia de su rápido movimiento, las colonias de *Proteus* tienden a ocupar toda la placa en un crecimiento en forma de **«ondas de mar»** característico (Figura 12.26*b*). Las células en la periferia de la colonia son más móviles que las del centro; así las primeras se mueven un poco más allá, disminuyen su movilidad, se asientan y se dividen a continuación dando lugar a una nueva generación de células muy móviles que vuelven a repetir la operación. Como resultado, la colonia madura consta de una serie de anillos más o menos concéntricos (Figura 12.26*b*).

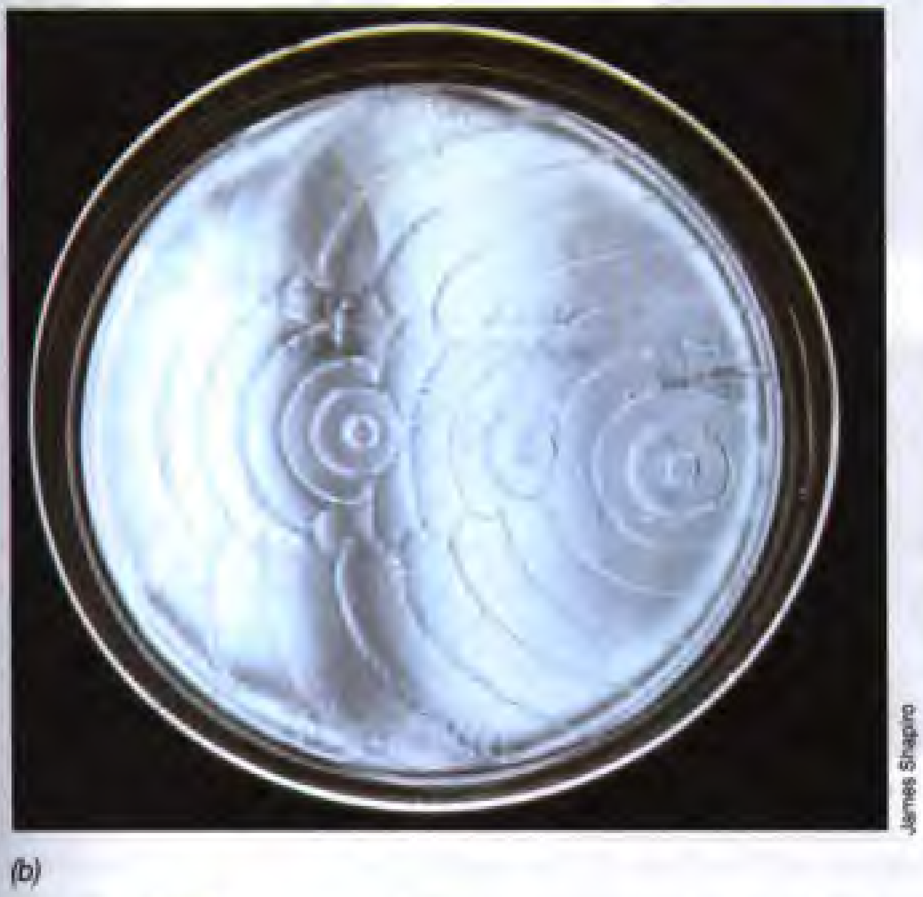
Productores de butanodiol: *Enterobacter, Klebsiella* y *Serratia*

Los géneros de este grupo están genéticamente más relacionados entre sí que con cualquiera de los del grupo de la fermentación ácida-mixta, lo que está de acuerdo con las diferencias fisiológicas observadas. Su DNA tiene un índice GC superior, siendo de 53-58 moles%. La clasificación actual de este grupo se recoge en la Tabla 12.16

Enterobacter aerogenes es una especie común en las aguas así como en el tracto intestinal de animales de sangre caliente, siendo también un patógeno ocasional, pudiendo producir afecciones del tracto urinario. Una especie de *Klebsiella*, *K. pneumoniae*, produce cuadros neumónicos. El hábitat natural es, sin embargo, el suelo y el agua. La mayoría de las klebsiellas pueden fijar nitrógeno (Sección 17.28), propiedad que no se encuentra en ninguna otra enterobacteria. El género *Serratia* forma un pigmento pirrólico que se conoce como **prodigiosina** (Figura 12.27) y se produce en la fase estacionaria como un metabolito secundario (*véase* Sección 30.2). Es interesante por contener el anillo pirrólico, que también se encuentra en pigmentos implicados en la transferencia de energía: porfirinas, clorofilas y ficobilinas (*véanse* Sección 17.2 y 17.3). Sin embargo, no existe evidencia de que la prodigiosina juegue un papel en la transferencia de energía y, de hecho, se desconoce su función. Especies de *Serratia* se aíslan de aguas y suelos así como, ocasionalmente, del intestino de diversos insectos y vertebrados, y solo esporádicamente del intestino humano.


(a)

D. E. Snyder


(b)

James Shapiro

Figura 12.26 Movilidad en placa de *Proteus*. (a) Células de *Proteus mirabilis* teñidas para flagelos; los flagelos peritricos de cada célula se agrupan en un extremo. (b) Colonia movil típica de *Proteus vulgaris*. Nótese el crecimiento concéntrico en anillos.

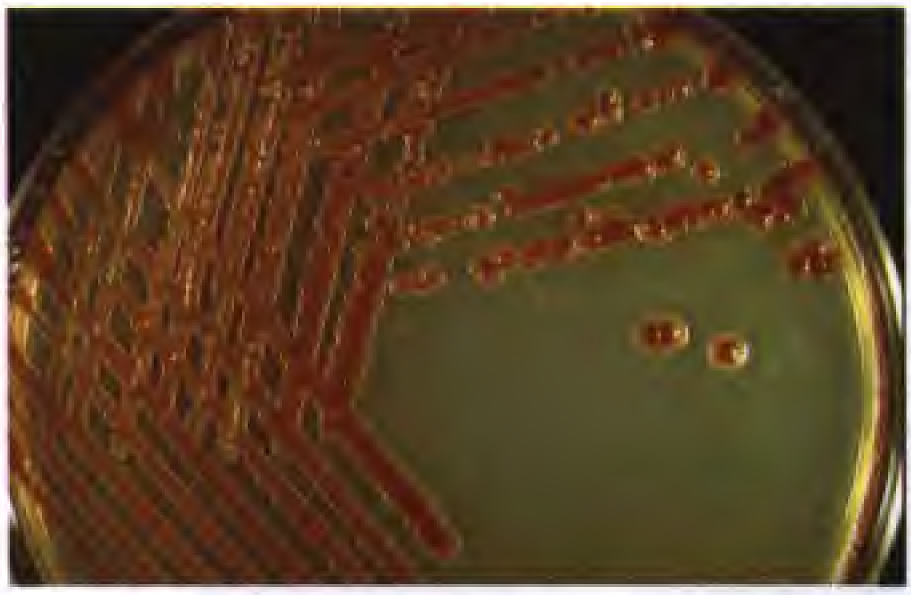

John Vercillo y Cheryl Broadie

Figura 12.27 Colonias de *Serratia marcescens*. El color rojo-anaranjado es debido a la prodigiosina, un pigmento de tipo pirrólico.

12.12 Vibrio y Photobacterium

Géneros clave

Vibrio
Photobacterium

El grupo de *Vibrio* contiene organismos bacilares incurvados, Gram negativos, anaerobios facultativos y que poseen un metabolismo fermentativo. La mayoría de los miembros del grupo de *Vibrio* poseen flagelos polares, aunque algunos son peritricos. Una diferencia importante entre este grupo y el del grupo entérico es su carácter de *oxidasa positiva* (*véase* Tabla 24.3), mientras que las enterobacterias, como ya se ha indicado, son *oxidasa negativa*. Aunque *Pseudomonas* también es oxidasa positiva y también con flagelación polar, *no* tienen metabolismo fermentativo, y por tanto, se separa de los vibrios por una simple prueba de fermentación de azúcar. Los géneros mejor estudiados dentro de este grupo son *Vibrio* y *Photobacterium*.

La mayoría de los vibrios y organismos relacionados son del medio acuático, bien de aguas dulces o marinas, aunque uno de los más representativos, *Vibrio cholerae* es patógeno para humanos, constituyendo la causa específica de la enfermedad conocida como *cólera* (*véanse* Secciones 21.11 y 28.6); este organismo no infecta normalmente a otros seres. El cólera es una de las enfermedades infecciosas más comunes en países en vías de desarrollo o subdesarrollados. El microorganismo se transmite casi exclusivamente por vía hídrica y los estudios de su distribución que se hicieron en el siglo XIX demostraron la importancia de la purificación de las aguas para zonas urbanas, como medio más idóneo para cortar los brotes coléricos (*véase* cuadro «Snow y el cólera», Capítulo 28). Discutiremos la patogénesis de *v. cholerae* en la Sección 21.11.

Vibrio parahaemolyticus es un organismo marino. Es una de las causas más comunes de casos de gastroenteritis en Japón (donde se consume pescado crudo rutinariamente) y también se le ha implicado en brotes de trastornos semejantes en otras partes del mundo incluyendo Estados Unidos. El microorganismo se aísla frecuentemente del agua de mar y de los moluscos y crustáceos que probablemente son sus hábitat primarios (*véase* Sección 28.1).

Photobacterium y la bioluminiscencia

Diversas bacterias bacilares, Gram negativas y flageladas polarmente, presentan la interesante propiedad de emitir luz (luminiscencia). La mayoría de estas bacterias se han clasificado en el género *Photobacterium*, pero unos cuantos con esta propiedad son en realidad del género *Vibrio* (Figura 12.28). La mayoría de las **bacterias bioluminiscentes** son marinas y se encuentran asociadas con peces. Algunos peces poseen un órgano especial en el que crecen las bacterias bioluminiscentes (Figura 12.28*c-f*). Otras viven saprofíticamente sobre peces muertos y, ocasionalmente, forman colonias visibles sobre la superficie del pez. (Para ver claramente la bioluminiscencia, debe observarse el material en una habitación completamente a oscuras, después de que los ojos se hayan adaptado a la oscuridad, Figura 12.28*a*, *b*). Aunque las especies de *Photobacterium* son anaerobias facultativas, son bioluminiscentes solamente en presencia de O_2. Para que se desarrolle esta actividad metabólica se necesitan varios componentes: la enzima **luciferasa** y un aldehído alifático de cadena larga (por ejemplo, el *dodecanal*), flavín mononucleótido reducido ($FMNH_2$) y O_2. El donador de electrones primario es el NADH de modo que la reacción puede representarse la manera siguiente:

$$\mathrm{FMNH_2 + O_2 + RCHO} \xrightarrow{\text{Luciferasa}} \mathrm{FMN + RCOOH + H_2O} + \text{Luz}$$

Por tanto, el sistema generador de luz representa un claro desvío de flujo de electrones que va directamente desde el $FMNH_2$ hasta el O_2 sin pasar por las cadenas transportadoras habituales típicas de otros flujos metabólicos tales como las quinonas o los citocromos.

Regulación de la bioluminiscencia

La enzima luciferasa posee una exclusiva forma de regulación denominada **autoinducción**. Las bacterias luminiscentes producen un *autoinductor* que se acumula en el medio de cultivo y cuando llega a niveles adecuados tiene lugar la autoinducción. El autoinductor en *Vibrio fischeri* se ha iden-

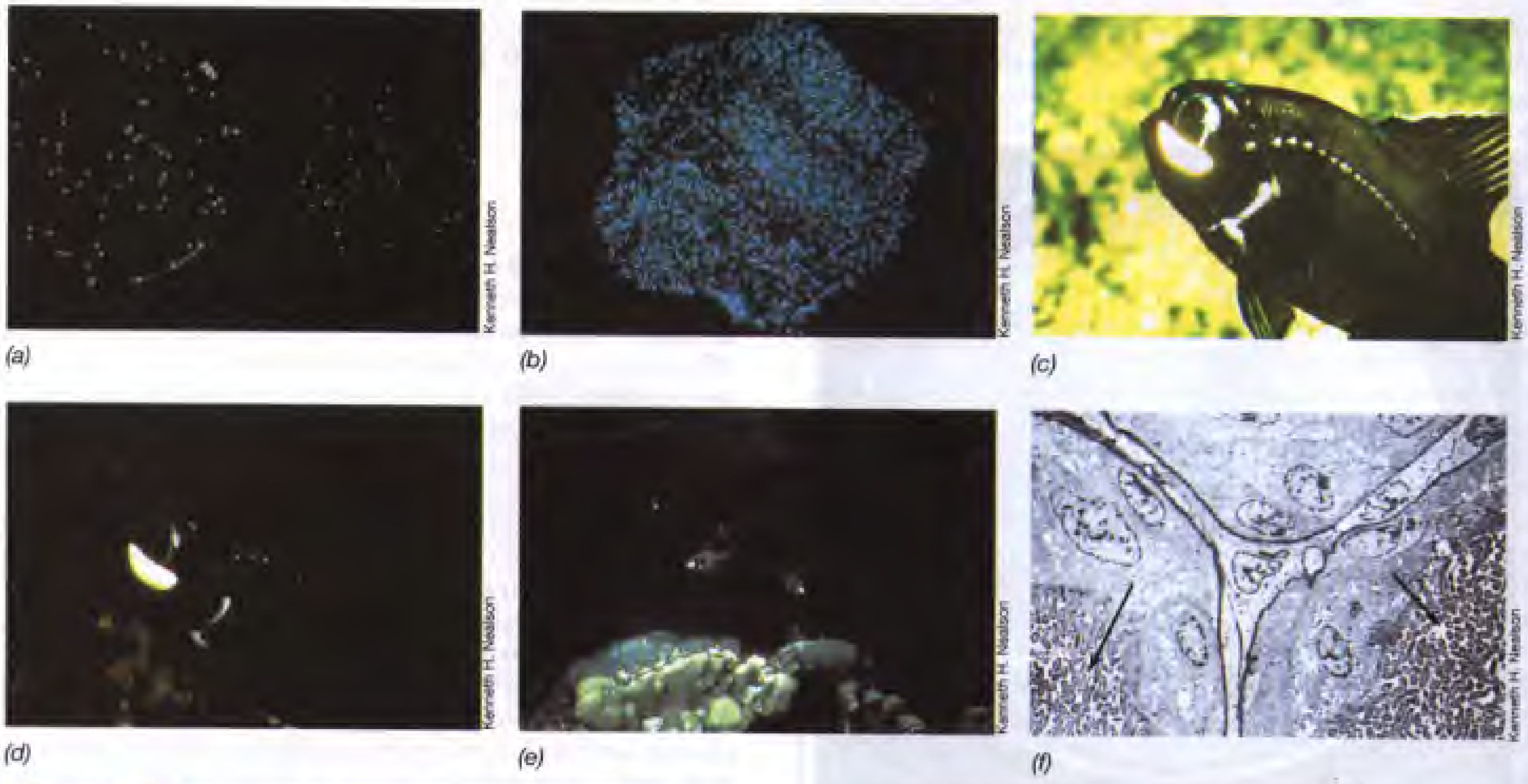


Figura 12.28 Bacterias bioluminiscentes y su función en la emisión de luz por ciertos peces. (a) Dos placas de estas bacterias fotografiadas bajo su propia luz. Nótese la diferencia de color. Izquierda, *Vibrio fischeri* cepa MJ-1, luz azul, y derecha, *V. fischeri* cepa Y-1, luz verde. (b) Colonias de *Photobacterium phosphoreum* fotografiadas bajo su propia luz. (c) Pez teleósteo *Photoblepharon palpebratus*; la zona brillante es el órgano luminoso que contiene las bacterias bioluminiscentes. (d) El mismo pez fotografiado bajo su propia luz. (e) Fotografía submarina nocturna de *P. Palpebratus* en los arrecifes de coral del Golfo de Eilat. (f) Micrografía electrónica del órgano luminoso de *P. Palpebratus* mostrando la densa disposición de las bacterias bioluminiscentes (flechas).

tificado como el N-β-cetocaprilhomoserina lactona. Por ello, los cultivos con baja densidad celular de bacterias luminiscentes no son luminosas, sino que sólo se hacen luminosas cuando el crecimiento alcanza una densidad suficientemente alta para que el autoinductor se acumule y funcione, a este mecanismo se denomina **percepción de quórum** (quorum sensing) por la naturaleza del fenómeno que depende de la densidad (*véase* Sección 8.9).

Debido a este proceso de autoinducción, es obvio que bacterias del grupo viviendo libres no son luminiscentes ya que el autoinductor no puede acumularse (Figura 12.28). Aunque todavía no está claro por qué la luminiscencia depende de la densidad en bacterias de vida libre, en las cepas simbióticas de las bacterias luminiscentes (*véase* Figura 12.28), la razón para que la luminiscencia depende de la densidad está clara: la luminiscencia solamente aparece cuando la densidad de población es suficientemente alta en el órgano luminoso del pez para permitir la emisión de un destello de luz. La genética de la *percepción de quórum* que utiliza la luminiscencia como modelo experimental se ha estudiado bastante y ya está claro que es algo que afecta no solamente al proceso de bioluminiscencia, sino que es un mecanismo de regulación de muchas bacterias para fenómenos que requieran un mínimo de número de células (Sección 8.9).

✓ 12.11-12.12 Revisión de conceptos

Las bacterias entéricas son un gran grupo de bacilos anaerobios facultativos de gran importancia tanto médica como para la biología molecular. *Vibrio* y *Photobacterium* son bacterias marinas y muchas son bioluminiscentes.

- ✓ ¿Cómo se distingue *Escherichia coli* de *Enterobacter aerogenes* basándose en la fisiología?
- ✓ Describe dos propiedades principales de *Proteus* que las distingue de otras bacterias entéricas
- ✓ ¿Qué es necesario para que un organismo como *Photobacterium* genere luz visible?

12.13 Ricketsias

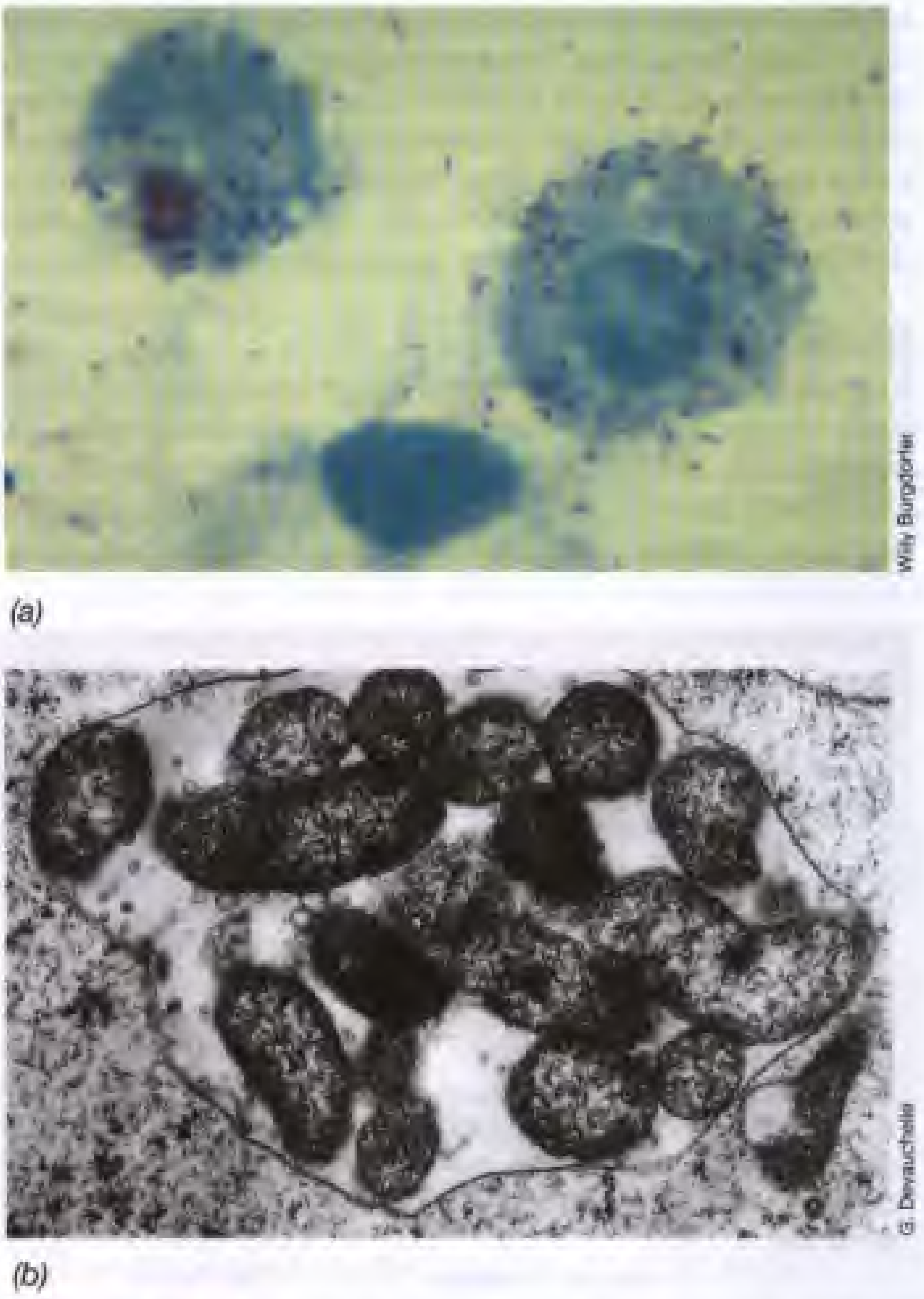
Géneros clave

Rickettsia
Wolbachia

Las riquetsias son proteobacterias cocoides Gram negativas o bacilos con tamaño de 0,3-0,7 μm de ancho y 1-2 μm de largo. Son todas ellas, con una excepción, *parásitos intracelulares estrictos* (Figura 12.29*a*) y todavía no han podido ser cultivadas en ausencia de células hospedadoras. Son agentes causantes de enfermedades humanas importantes, tales como el tifus exantemático, la fiebre del las montañas rocosas o la fiebre Q, entre otras (*véase* Sección 27.3). Las micrografías electrónicas de riquetsias muestran propiedades típicas de bacterias normales (Figura 12.29*b*); se ve tanto la pared celular como la membrana citoplasmática. La pared celular contiene ácido murámico y ácido diaminopimélico. Contienen lógicamente tanto DNA como RNA y se dividen por fisión binaria normal con tiempos de generación de unas 8 horas. La penetración de la futura célula hospedadora es un proceso activo y requiere que tanto la riquetsia como la célula estén metabólicamente activas. Una vez dentro, la bacteria se multiplica en el citoplasma y sigue haciéndolo hasta que virtualmente toda la célula está cargada de parásitos (Figuras 12.29 y 27.3), entonces la célula estalla liberando la progenie al medio circundante. La Tabla 12.17 recoge las principales características de cuatro géneros clave de riquetsias.

Metabolismo y Patogénesis

Se han dedicado muchos esfuerzos, estudiar las rutas metabólicas de las riquetsias en un intento de dilucidar el hecho de que sean parásitos intracelulares obligados. Muchas riquetsias poseen un metabolismo energético muy distintivo, en el sentido de que solamente pueden oxidar el ácido glutámico o la glutamina, siendo incapaces de utilizar la glucosa o ácidos orgánicos. Sin embargo, *Coxiella burnetti* es capaz de utilizar tanto la glucosa como el piruvato como donadores de electrones. Poseen una cadena respiratoria



Willy Burgdorfer

G. Devauchelle

Figura 12.29 Riquetsias intracelulares. (a) *Rickettsia rickettsii* en las células de la túnica vaginal del campañol (roedor) de *Microtus pennsylvanicus*. Diámetro de 0,3 μm. (b) Micrografía electrónica de *Rickettsia popilliae* en un eritrocito del hospedador, del escarabajo *Melolontha melolontha*. Nótese que la bacteria crece en el interior de la vacuola, en la célula del hospedador.

completa con citocromo y puedan llevar a cabo la fosforilación con transporte de electrones a partir de NADH. Son también capaces de sintetizar algunas moléculas pequeñas necesarias para la síntesis y el crecimiento pero el resto lo toman de la célula que parasitan.

Estas bacterias no sobreviven mucho tiempo fuera del hospedador, lo que explica que sean transmitidas de animal a animal vehiculizadas por un artrópodo. Cuando el insecto obtiene sangre de un vertebrado infectado toma también la riquetsia que penetra las células epiteliales del tracto gastrointestinal del artrópodo. Allí se multiplican y más tarde aparecen en las heces. Cuando el insecto se alimenta de otro animal no infectado, le inocula la riquetsia bien directamente con el aparato bucal o bien por las heces que deposita en la piel. Sin embargo, el agente causal de la fiebre Q (*Coxiella burnetti*) puede transmitirse por vía aérea al aparato respiratorio. Esta bacteria es la más resistente de las riquetsias al daño físico debido a que es capaz de formar una especie de forma de resistencia y así sobrevivir en el aire. *Rochalimaea* crece *sobre la superficie* de las células eucarióticas en vez de crecer en el interior del citoplasma o del núcleo. *Rochalimaea quintana* es el agente causal de la fiebre de las trincheras, una enfermedad que diezmó las tropas de ambos bandos en la Primera Guerra Mundial. Algunas de las especies de *Ehrlichia* causan enfermedades en el hombre y en otros animales. Dos de ellas las *erliquiosis* en humanos y *la fiebre de potomac* en caballos son afecciones muy debilitantes para los que la sufren (*véase* Sección 27.3).

Wolbachia

El género *Wolbachia* contiene especies bacilares de Proteobacterias que son parásitos intracelulares de artrópodos (Figura 12.30). Está filogenéticamente relacionada con las riquetsias y puede tener efectos muy severos en los insectos, incluyendo inducción de partenogénesis (desarrollo de huevos no fertilizados), de la muerte de machos así como de procesos de feminización (conversión de machos a hembras).

Wolbachia pipientis es la especie mejor estudiada del género. Las células colonizan los huevos de insectos (Figura 12.30) donde se multiplican en vacuolas de las células. *W. pipientis* pasa de las hembras infectadas a la progenie a través de sus huevos en una transmisión vertical. La partenogénesis inducida por esta riquetsia se produce en diversas especies de avispas. En estos insectos salen machos partenogénicos con un solo juego de cromosomas de huevos no fertilizados, mientras que las hembras surgen de huevos fertilizados y contienen, por tanto, dos juegos de cromosomas. Sin embargo, huevos no fertilizados pero infectados con *Wolbachia*, dan lugar a hembras diploides, ya que la bacteria de alguna manera induce a la replicación cromosomal y surgen así hembras partenogenéticas. Este proceso se trunca si suministramos antibiótico que elimina la *Wolbachia* de las avispas. En ciertas especies de insectos, existe una *Wolbachia* que daña las glándulas productoras de hormonas masculinas con lo que solamente nacerán hembras. En otros insectos, como es en algunos escarabajos y mariposas, la infección por *Wolbachia* mata a los machos pero no a las hembras. Además de estas anomalías en los ciclos reproductores, algunas especies de insectos necesitan a *Wolbachia* para su supervivencia. Por ejemplo, en nematodos causantes de elefantiasis y la ceguera fluvial al ser tratados con antibióticos antibacterianos destruye los gusanos porque elimina a la *Wolbachia* simbionte.

Como otras riquetsias, *W. pipientis* tiene un genoma pequeño (aproximadamente de 1,5 mB) que ya ha sido secuenciado. Aunque este género no causa enfermedades directas en vertebrados o invertebrados, la interferencia con los ciclos reproductores induce a preguntarse si realmente ha interveni-

TABLE 12.17 Caracteristicas de las riquetsias[a]

Especie	Grupo	Insecto	Localización celular	DNA (GC mol %)	Grupo filogenético[b]	Hibridación de DNA con *R. rickettsii* (%)[a]
Rickettsia						
R. rickettsii	Fiebre maculosa	Chinche	Citoplasma y núcleo	32-33	Alfa	100
R. prowazekii[c]	Tifus exantemático	Piojo	Citoplasma	29-30		53
R. typhi	Tifus murino	Pulga	Citoplasma	29-30		36
Rochalimaea						
R. quintana	Fiebre de las trincheras	Piojo	Epicelular	39	Alfa	30
R. vinsonii	—	Campañol (roedor)	Epicelular	39		30
Coxiella						
C. burnetii	Fiebre Q	Chinche	Vacuolas	43	Gamma	—
Ehrlichia						
	Erliquiosis humana Fiebre de potomac (caballos)	Chinches animales	Leucocitos mononucleares	—	Alfa	—
Wolbachia[d]	—	Artrópodos	Citoplasma	30	Alfa	—

[a] Para una discusión sobre la hibridación DNA:DNA, *véase* la Sección 11.9.

[b] Todas son Proteobacterias.

[c] El genoma de este microorganismo se ha secuenciado y contiene similitudes con el de las mitocondrias.

[d] No es patógeno de humanos ni de animales.

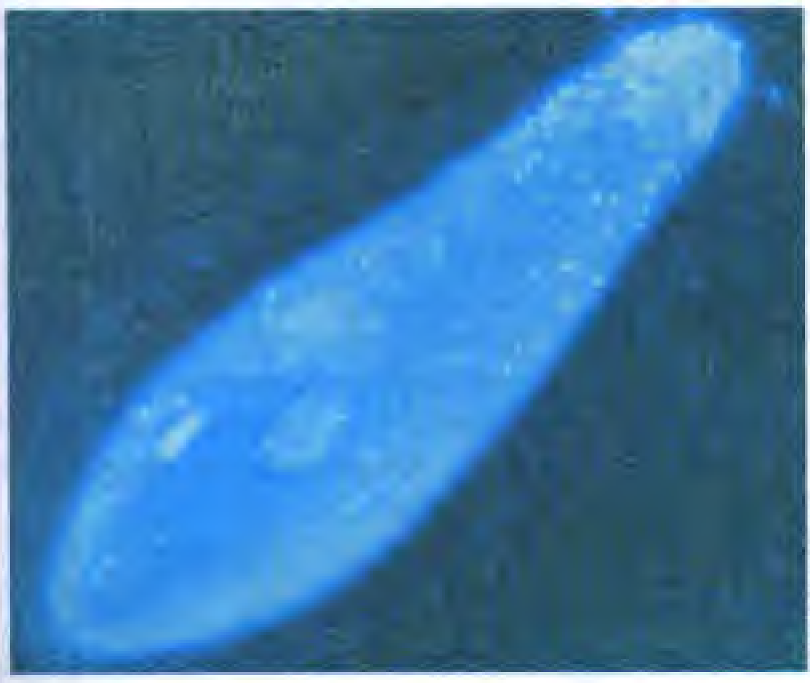

Richard Stouthamer

Figura 12.30 Micrografía de una tinción con 4′, 6-diamidino-2′ fenilindol dihidrocloruro de DAPI, (*véase* Sección 18.3) de los huevos de la avispa *Trichogramma kaykai* infectada con *Wolbachia pipientis* que induce la partenogénesis. Las células de *W. Pipientis* se localizan preferentemente en la zona estrecha del huevo.

do en el proceso de especiación de los artrópodos. Sin embargo ya que la asociación de *Wolbachia* con los insectos es tan común puede ser que el efecto sobre los ciclos reproductores sea un efecto colateral a una simbiosis verdadera entre *Wolbachia* y el insecto en las que las células de *Wolvachia*, consiguen una fuente de nutrientes y un entorno protegido y los insectos se benefician de alguna forma aun desconocida.

✓ 12.13 Revisión de conceptos

Las riquetsias son parásitos estrictos intracelulares muchas de las cuales causan enfermedades. Son deficientes en muchas funciones metabólicas y obtienen metabolitos clave a partir de sus hospedadores.

- ✓ Nombre una enfermedad causada por una especie de *Rickettsia*.
- ✓ ¿Cuál es el significado de la frase «parásito intracelular estricto»?
- ✓ ¿Qué efectos puede tener *Wolbachia* sobre los insectos?

12.14 Espirilos

Géneros clave

Spirillum
Bdellovibrio
Campylobacter

Los **espirilos** son Proteobacterias Gram negativas, móviles, con morfología de espiral que poseen una gran variedad de atributos fisiológicos. Algunos de los criterios utilizados en su taxonomía incluyen: la forma celular, el tamaño, el número de flagelos polares (uno o varios), la relación con el oxígeno (aerobios estrictos, microaerófilos y facultativos), relaciones con las plantas (simbiontes o patógenos) o con los animales (como patógenos), capacidad fermentativa y otras características fisiológicas (fijación de nitrógeno, osmotolerancia y naturaleza termofílica). Los géneros incluidos en este manual se resumen en la Tabla 12.18.

Spirillum, Aquaspirillum, Oceanospirillum y *Azospirillum*

Estos son bacilos incurvados helicoidalmente, móviles por flagelos polares (normalmente dos manojos, uno en cada extremo) (*véase* Figura 12.31). El número de vueltas de la hélice puede variar de menos de una vuelta completa (en cuyo caso el microorganismo se parece a un vibrio) hasta muchas vueltas que se parecen a las espiroquetas (*véase* Sección 12.33), pero de las que difiere tanto filogenéticamente como por el hecho de no poseer endoflagelos (axostilo) sino flagelos normales.

TABLA 12.18 Características de los géneros con forma de espiral[a]

Género	Grupo filogenético[b]	Características	DNA (GC mol %)
Spirillum	Beta	Diámetro celular 1,7 μm; microaerófilos; aguas dulces	36-38
Aquaspirillum	Alfa o beta	Diámetro celular 0,2-1,5 μm; aerobio; aguas dulces	49-66
Magnetospirillum	Alfa	Morfología vibrioide; diámetro celular 0,3 μm; contiene magnetosomas; microaerófilos	65
Oceanospirillum	Gamma	Diámetro celular 0,3-1,2 μm; aerobios; marinos (requieren 3% de NaCl)	42-51
Azospirillum	Alfa	Diámetro celular 1 μm; microaerófilos; suelo y rizosfera; fija N_2	68-70
Herbaspirillum	Beta	Diámetro celular 0,6-0,7 μm; microaerófilos; suelo y rizosfera; fija N_2	66-67
Campylobacter	Épsilon	Diámetro celular 0,2-0,8 μm; microaerófilos a anaerobio; patógeno o comensal en humanos; único flagelo polar	30-38
Helicobacter	Épsilon	Diámetro celular 0,5-1 μm; penacho de flagelos polares; asociado con úlcera pilórica en humanos	36-38
Bdellovibrio	Delta	Diámetro celular 0,25-0,4 μm; aerobio; depredador de otras bacterias; flagelo polar envainado	33-52
Ancyclobacter	Alfa	Diámetro celular 0,5 μm; bacilos curvados formando anillos; inmóvil, aerobio; a veces con vesículas de gas	66-69

[a] Todas son Gram negativas respiradoras y nunca fermentadoras.
[b] Todas son Proteobacteria.

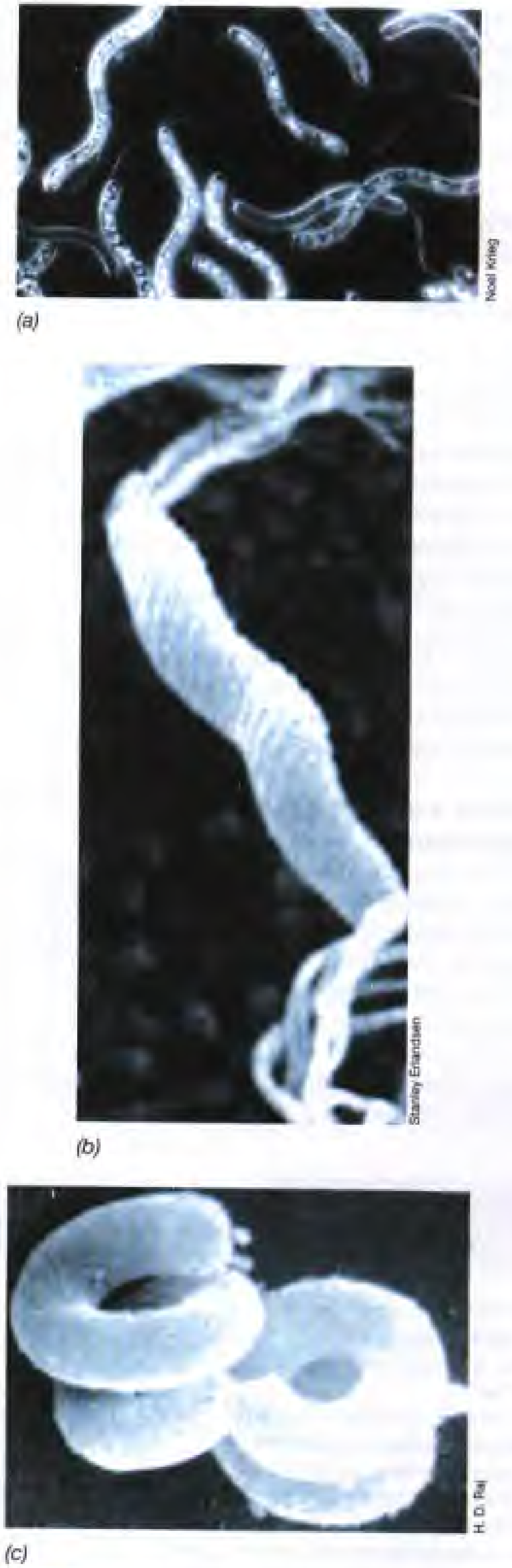


Figura 12.31 (a) *Spirillum volutans*, visualizado en un microscopio de campo oscuro mostrando penachos de flagelos y gránulos de volutina (polifosfato). Las células poseen unas dimensiones de 1,5 × 2,5 µm. (b) Micrografía electrónica de barrido de un espirilo intestinal. Nótese los penachos de flagelos polares y la estructura espiralada de la superficie celular. (c) Micrografía electrónica de barrido de *Ancylobacter linguale*. Diámetro de 0,5 µm.

Algunos de los espirilos son muy grandes y ya fueron descritos por los padres de la Microbiología. Es bastante probable que Antonie van Leewenhoek describiera *Spirillum* hacia 1670 (Sección 1.5); el género fue oficialmente creado por el protozoólogo Ehrenberg en 1832. El microorganismo que veían hoy lo llamamos *Spirillum volutans*, que es una bacteria bastante grande (Figura 12.31*a*). Un organismo fototrófico que se parece a *S. volutans* es *Thiospirillum* (*véase* Figura 12.4*b*). *Spirillum volutans* es microaerofílico, requiriendo O_2, pero siendo inhibido a concentraciones normales del aire. Otra característica importante de *S. volutans* es la formación de gránulos de volutina o polifosfatos (*véase* Figura 12.31*a* y Sección 4.13).

Azospirillum lipoferum es un microorganismo fijador de nitrógeno que fue originariamente descrito como *Spirillum lipoferum* por Beijerinck en 1922. Recientemente ha adquirido una notable notoriedad por su facultad de establecer relaciones simbióticas con plantas tropicales y cereales (*véase* Sección 19.28). Los espirilos de diámetro más estrecho (no microaerofílicos) se han separado en dos géneros: *Aquaspirillum* y *Oceanospirillum* según que sus hábitat primarios sean aguas dulces o saladas, respectivamente (Tabla 12.18). Se han descrito numerosas especies de ambos géneros separadas sobre la base de características fisiológicas. Indudablemente, las especies de estos géneros juegan un papel importante en el reciclamiento de la materia orgánica en ambientes acuáticos.

Espirilos magnetotácticos

Se han aislado a partir de hábitatss de agua dulce espirilos microaerofílicos con capacidad de responder a campos magnéticos. Estos organismos muestran un movimiento espectacular dirigido hacia un campo magnético, que se conoce como **magnetotactismo.** En un campo magnético artificial los espirilos magnéticos rápidamente orientan su eje longitudinal a lo largo del eje N-S del campo magnético. Dentro de las células existen 5-40 partículas de magnetita (Fe_3O_4) y ferrita (Fe_3S_4) que se denominan **magnetosomas** (Sección 4.13 y Figura 4.54 y Figura 12.32) que funcionan a modo de brújula orientándoles en un determinado campo magnético. Las bacterias magnéticas pueden poseer una o dos polaridades dependiendo de la orientación de los magnetosomas dentro de las células. Las células en el hemisferio Norte poseen el polo detector del norte de sus magnetosomas por delante de sus flagelos, por lo que siempre se mueven hacia el Norte. Las células en el hemisferio Sur poseen la polaridad opuesta por lo que siempre se mueven hacia el Sur. Aunque la función ecológica no está clara, se ha propuesto que esta propiedad es útil y proporciona a estas bacterias ventajas selectivas sobre otras para mantener estos organismos microaerofílicos en zonas de baja concentración de oxígeno en la interfase óxica/anóxica. El espirilo *Magnetospirillum magnetotacticum* (Figura 12.32 y Tabla 12.18) es el principal microorganismo dentro de este grupo.

Bdellovibrio

Estos pequeños organismos vibrioides poseen la singular característica de parasitar a otras bacterias, utilizando

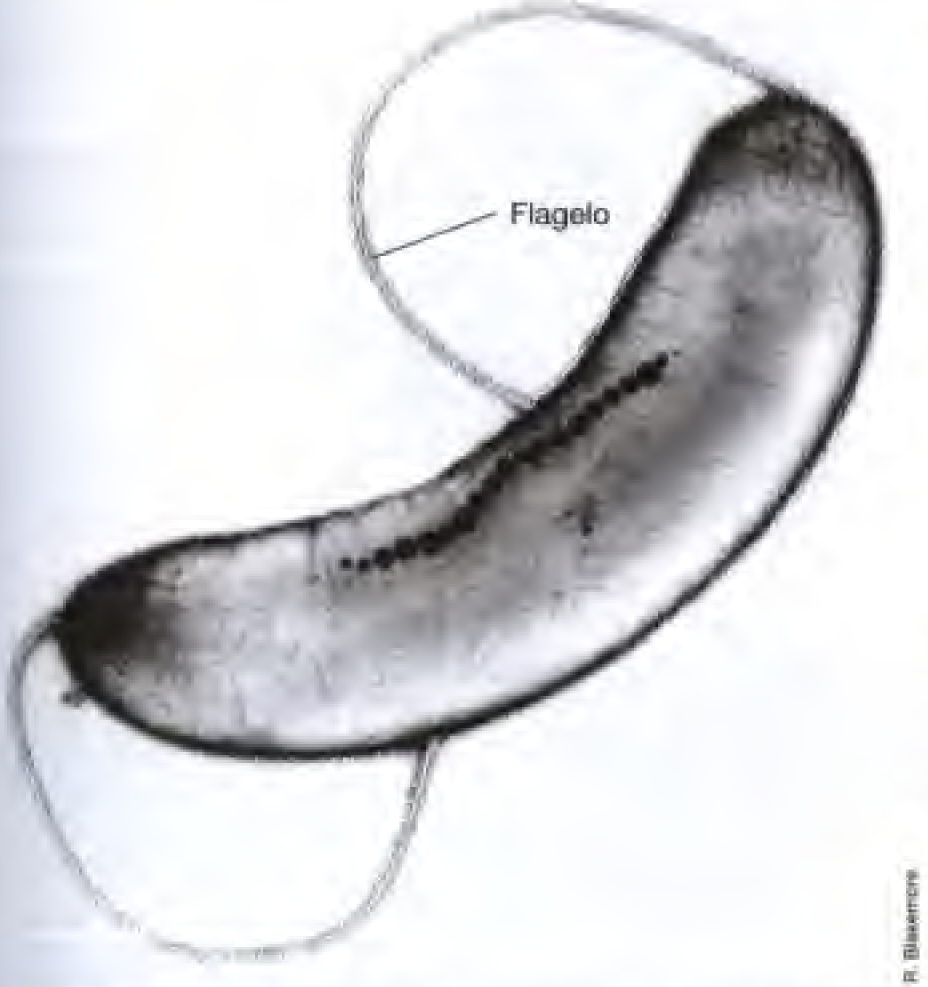


Figura 12.32 Micrografía electrónica (tinción negativa) de un espirilo magnetotáctico, *Magnetospirillum magnetotacticum*. Una célula mide 0,3 × 2 µm. La bacteria contiene partículas de magnetita (Fe_3O_4) que se denominan magnetosomas (Figura 4.54) dispuestos en cadena; las partículas alinean la célula a lo largo de la líneas geomagnéticas. El organismo se aisló de una planta de tratamiento de aguas residuales en Durham, New Hampshire.

sus nutrientes citoplasmáticos como base de su sustento. Estos depredadores bacterianos son pequeños, muy móviles que se fijan a sus presas como verdaderas sanguijuelas, *Bdellum* en latín. Se ha aislado otras bacterias depredadoras como es el caso de *Vampirococcus*. Sin embargo *Bdellovibrio* posee un modo exclusivo de ataque, desarrollándose además en el espacio periplásmico. Después de la unión de *Bdellovibrio* a su presa, penetra a través de la pared celular y se replica en el espacio periplásmico, formando eventualmente una estructura esférica que denomina **bdeloplasto**. Los estadios de unión y penetración se muestran en micrografías electrónicas en la Figura 12.33 y en forma de diagrama en la Figura 12.34. Las especies de *Bdellovibrio* pueden atacar una gran variedad de bacterias Gram negativas; las Gram positivas son inmunes a estos ataques.

Bdellovibrio es un aerobio estricto que obtiene su energía por la oxidación de aminoácidos y del acetato. Además, asimila nucleótidos, ácidos grasos e incluso en algunos casos toman proteínas enteras directamente de su presa sin necesidad de romper en aminoácidos o péptidos previamente. Está bastante claramente establecido, que este modo de vida depredadora en *Bdellovibrio* ha ido acompañado en su evolución de procesos bioquímicos diferentes y muy interesantes. A pesar de la predación, se han podido aislar cepas de *Bdellovibrio* que son independientes de la predación y que derivan de cepas predadoras, lo que muestra que la predación no es estricta. Las cepas independientes de la predación pueden cultivarse en medios complejos que contienen extracto de levadura y peptona.

Filogenéticamente, los bdelovibrios caen dentro de la subdivisión delta de Proteobacteria (Figura 12.1) y contienen un genoma la mitad del de *E.coli*. Taxonómicamente se reconocen tres especies de *Bdellovibrio* de acuerdo a resultados de hibridación DNA:DNA. Además de ser en sí mismos depredadores, a su vez, pueden ser parasitados por bacteriófagos o *bdelofagos* que son casi exclusivamente líticos con DNA monocatenario (*véase* Sección 11.9).

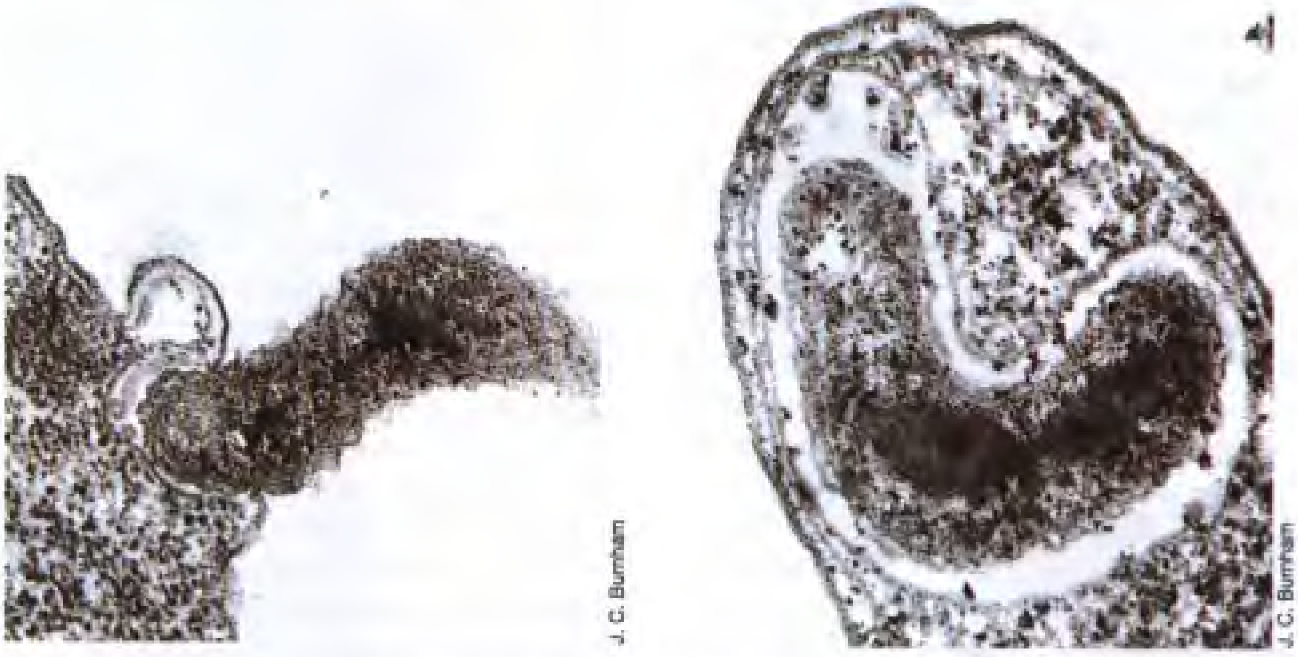
Los miembros de este género están ampliamente distribuidos en suelo y en las aguas, incluyendo las saladas. La detección y aislamiento de estas bacterias recuerda a los métodos utilizados para el estudio de los virus bacterianos (Sección 9.4). Las bacterias presa se esparcen por la superficie del cultivo para que formen un césped y en la superficie se inocula una pequeña cantidad de una suspensión de suelo, que ha sido previamente filtrado por membranas que retienen la mayoría de las bacterias, pero no *Bdellovibrio*. Después de la incubación se desarrollan calvas en el césped bacteriano, allá donde se desarrolló una infección por *Bdellovibrio*, calvas que a todos los efectos nos recuerdan a las de los fagos. Sin embargo, y al contrario que en el caso de los fagos, donde las calvas continúan creciendo si lo hace la bacteria hospedadora, en el caso de *Bdellovibrio* la calva continúa creciendo con idependencia de la viabilidad de la bacteria hospedadora. Los cultivos puros de *Bdellovibrio* se aíslan fácilmente de estas calvas de lisis. Los *Bdellovibrio* se han aislado de una gran variedad de suelo y puede afirmarse que son habitantes habituales de ellos.

Ancylobacter

Los miembros del género *Ancylobacter* tienen forma de anillo, no móviles, quimioorganotrofos y nutricionalmente muy diversos (Figura 12.31*c*). Se parecen a vibrios enrollados sobre sí mismos y son comunes en ambientes acuáticos. Existe una bacteria muy similar, pero fototrófica, dentro del grupo de las bacterias rojas no del azufre: *Rhodocyclus purpureus* (*véase* Figura 12.7*e*).

Campylobacter y *Helicobacter*

Estos dos géneros son representativos de la subdivisión *épsilon* de las Proteobacterias. Son Gram negativas, móviles y la mayoría patógenos para humanos y otros animales. *Campylobacter* y *Helicobacter* son ambos microaerofílicos y deben ser cultivados a partir de muestras clínicas en medios con baja tensión de oxígeno (3-15%) y alta concentración de CO_2 (3-10%). Las especies de *Campylobacter* causan enteritis aguda que conduce a cuadros sangrantes diarreicos; la patogénesis es debida a varios productos incluida una enterotoxina relacionada con el colerágeno (*véase* Sección 21.11). *Helicobacter pylori* está muy relacionado con *Campylobacter* y causa gastritis crónica y aguda, lo que conduce a *úlceras pépticas*. Se discuten de una manera más detallada las enfermedades causadas por *Campylobacter* y *Helicobacter* en la Sección 29.8


J. C. Burnham

J. C. Burnham

Figura 12.33 Estadios de unión y penetración de la presa por *Bdellovibrio*. La célula de *Bdellovibrio* mide 0,3 µm de diámetro. (a,b) Micrografías electrónicas de cortes finos de *Bdellovibrio* atacando a *Escherichia Coli*; (a) Penetración temprana; (b) Penetración completa. *Bdellovibrio* está encerrado en una membrana de la presa (el bdeloplasto) y se replica en el espacio periplásmico entre la pared y la membrana (*véase* Figura 12.34).

✓ 12.14 Revisión de conceptos

Los espirilos tienen forma de espiral y son procariotas quimioorganotrofos ampliamente distribuidos en medios acuáticos. Los géneros *Helicobacter* y *Campylobacter* son patógenos. Los espirilos se encuentran en las subdivisiones alfa, beta, gamma, delta y épsilon de las Proteobacterias.

- ✓ ¿Qué es un *gránulo de volutina*?
- ✓ ¿Qué tienen de particular los espirilos *Bdellovibrio y Magnetospirillum?*

12.15 Proteobacterias con vaina: *Sphaerotilus y Leptothrix*

Géneros clave

Sphaerotilus
Leptothrix

Las bacterias envainadas son Proteobacterias de la subdivisión beta (Tabla 12.1) con un ciclo de vida único que implica la elaboración de una forma nadadora dentro de la vaina. Bajo ciertas (generalmente desfavorables) condiciones, la forma nadadora sale fuera siendo dispersada hacia nuevos ambientes, dejando atrás la vaina vacía. Cuando las condiciones son favorables tiene lugar el crecimiento dentro del filamento, lo que conduce a la formación de filamentos muy largos, literalmente llenos de células. Estas bacterias son comunes en aguas dulces con abundante materia orgánica como es el caso de arroyos contaminados y en diferentes fases de las plantas purificadoras de aguas residuales (*véase* Sección 28.2). En aquellos hábitat en los que abundan formas reducidas de hierro o manganeso, las vainas se recubren de hidróxido férrico u óxido de manganeso (*véase* Figura 17.29). La precipitación del hierro es probablemente debida a reacciones químicas pero algunas bacterias envainadas tienen la propiedad bioquímica de

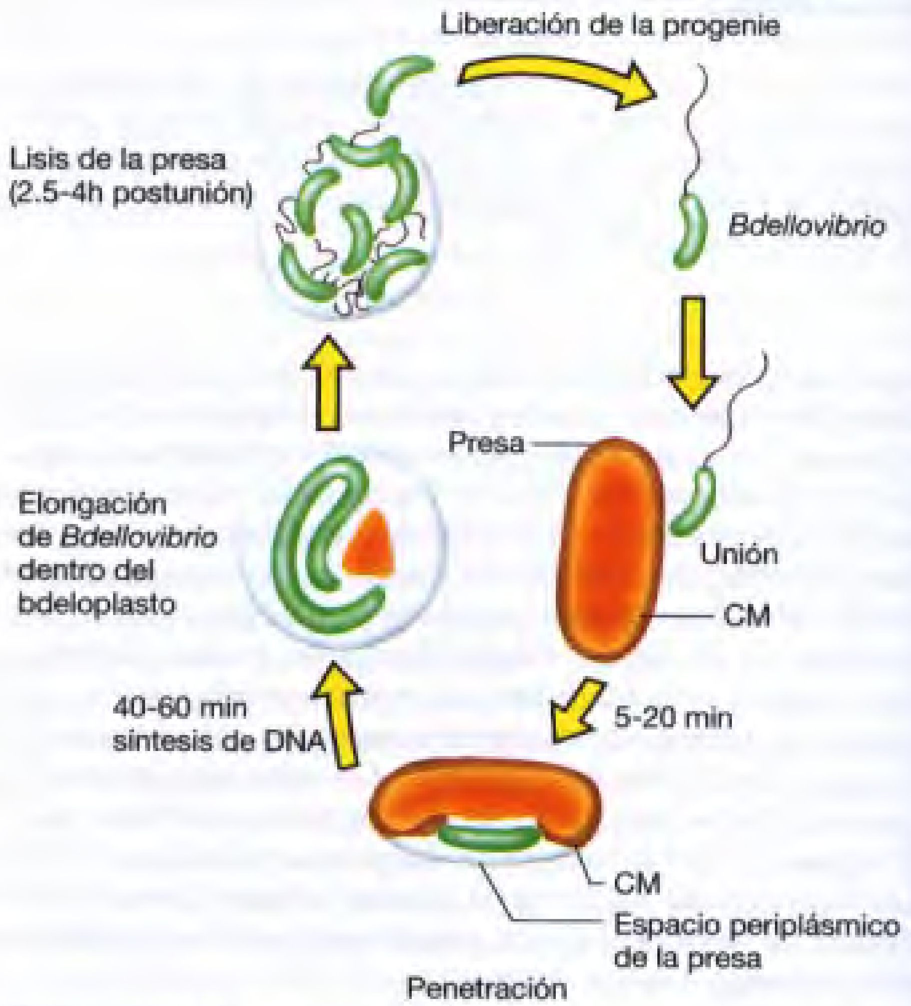
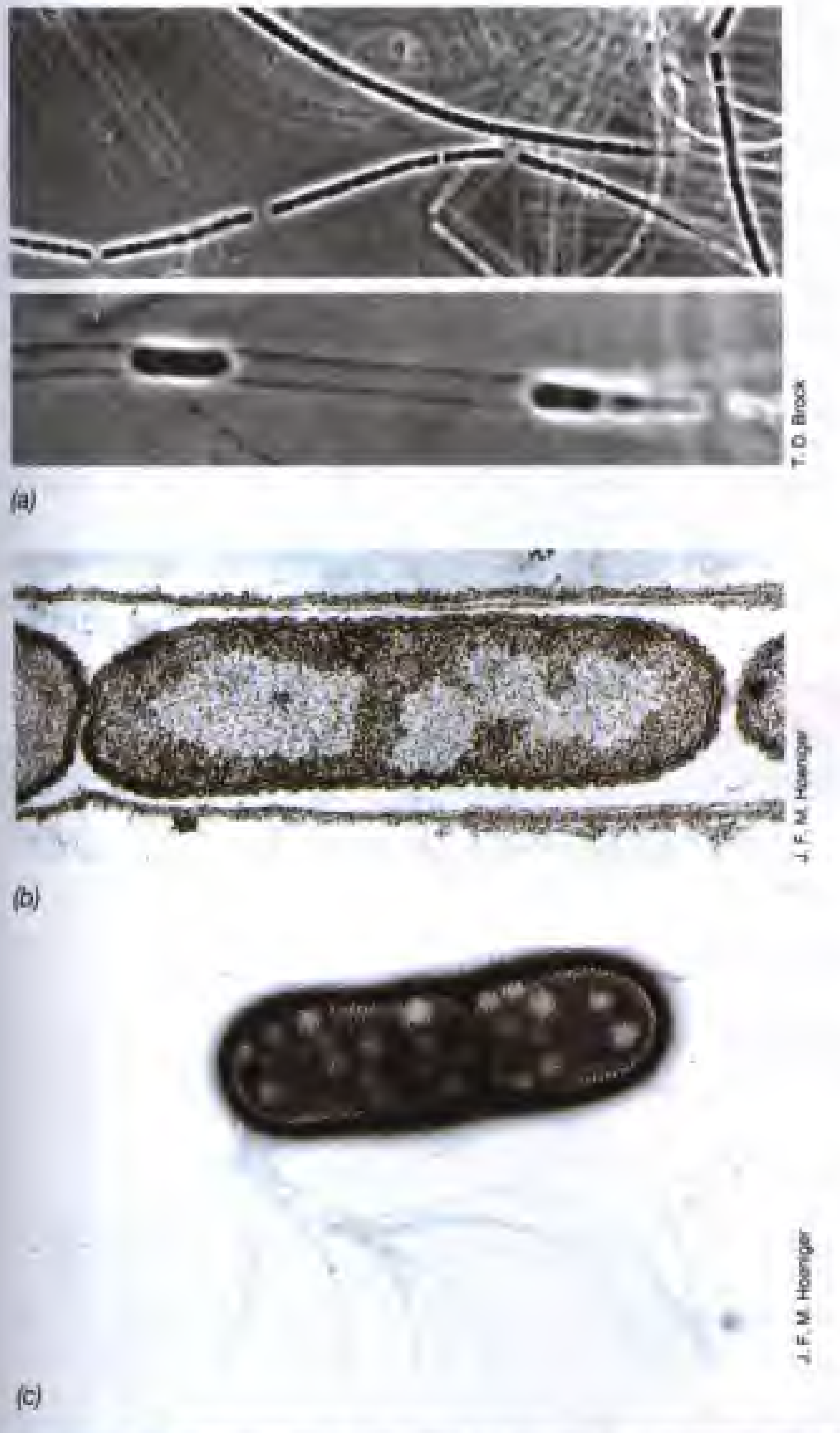


Figura 12.34 Ciclo celular de la bacteria predadora *Bdellovibrio bacteriovorus*. Después del primer contacto entre el *Bdellovibrio* movil y una bacteria Gram negativa, tiene lugar la penetración. Una vez en el espacio periplásmico *Bdellovibrio* se alarga y en cuatro horas libera la progenie. El número de células producidas depende del tamaño de la bacteria parasitada. Por ejemplo *E. Coli* produce una media de 5-6 células de *Bdellovibrio* por bacteria y de 20-30 cuando el hospedador es *Spirillum*. CM, membrana citoplasmática de la presa.

oxidar el ion manganoso hasta óxido mangánico. Aquí se incluyen dos géneros representativos: *Sphaerotilus* y *Leptothrix*, cuyos miembros oxidan Mn^{2+}.

Sphaerotilus

El filamento de *Sphaerotilus* está formado por células bacilares con extremos redondeados rodeados por una vaina apretada. Esta vaina fina y transparente es muy difícil de ver cuando se encuentra llena de células, pero cuando está parcialmente vacía se pueden ver fácilmente con microscopía de contraste de fases (Figura 12.35*a*) o por tinción. Las células en el interior de la vaina se dividen por fisión binaria (Figura 12.35*b*) de tal manera, que la nueva célula que se localiza en el extremo tiene que sintetizar nuevo material de la vaina y, por ello, la vaina siempre se forma en los extremos de los filamentos. Las células individuales tienen 1-2 μm de ancho y 3-8 μm de largo y son Gram negativas. Las células son liberadas al ambiente cuando las condiciones son desfavorables. Las células son entonces móviles por flagelación polar lofotrica (los flagelos están dispuestos en un haz en uno de los polos) (Figura 12.35*c*). Probablemente, los flagelos se sintetizan antes de que las células abandonen la vaina y así facilitan su evacuación. Se cree que la forma nadadora pueda migrar unida a algún tipo de soporte o partícula sólida, de modo que al germinar cada célula regenera un nuevo filamento. La vaina, que no posee ácido murámico u otros componentes de la capa de péptido glicano de la pared celular, es un complejo de proteína, lípido y polisacárido, en cierta manera similar a las cápsulas típicas de muchas *Bacteria* Gram negativa pero diferente en el sentido de que es una estructura linear.



T. D. Brock

J. F. M. Hoeniger

J. F. M. Hoeniger

Figura 12.35 *Sphaerotilus natans*. Anchura celular de 2 μm. (a) Micrografía de contraste de fases de material recogido de un arroyo contaminado. Crecimiento activo (arriba) y células nadadoras abandonando la vaina. (b) Micrografía electrónica (corte fino) de un filamento. (c) Micrografía electrónica (tinción negativa) de una célula nadadora. Nótese el penacho de flagelos.

Sphaerotilus es versátil nutricionalmente hablando, capaz de utilizar una diversidad de compuestos orgánicos simples como fuentes de carbono y de energía. El nitrógeno lo utilizan en forma inorgánica. Es aerobio estricto. El crecimiento más activo de estas bacterias ocurre en el otoño, en arroyos sin mucha corriente que se llenan de las hojas caídas recientemente. Los filamentos de *Sphaerotilus* son los componentes fundamentales de lo que los técnicos que trabajan en plantas de aguas residuales denominan como «hongo de las aguas residuales» y que crece como masa viscosa unida a las piedras y rocas de los afluentes de las plantas purificadoras. Como fango activado funciona bien para la depuración de las aguas residuales (*véase* Sección 28.2) *Sphaerotilus* crece como lo hace *Beggiatoa* (*véase* Sección 12.4) pero un crecimiento desmesurado puede dar lugar a lo que se conoce como «barros engrosados» lo que ocurre con *Beggiatoa*. Estos barros engrosados, sedimentan mal y por tanto dificultan notablemente el proceso de clarificación de las aguas.

Leptothrix

La capacidad de *Sphaerotilus* y de *Leptothrix* para precipitar óxidos de hierro en las vainas, está perfectamente demostrada y son muy frecuentemente detectadas en aguas ferrugíneas (Figura 12.36). La precipitación ocurre normalmente cuando el hierro es quelado en ácido húmico o tánico; el hierro se queda en las vainas mientras que los compuestos orgánicos son metabolizados como fuente de carbono y energía por parte de estas bacterias.

Además de la oxidación del ion ferroso, *Leptothrix* es capaz de oxidar Mn^{2+} hasta Mn^{4+}. La reacción transcurre de la manera siguiente y libera energía neta:

$$Mn^{2+} \tfrac{1}{2}O_2 + H_2O \rightarrow MnO_2 + 2H^+ \qquad \Delta G^{0\prime} = -68\text{kJ}$$

Existen evidencias de que la oxidación de Mn^{2+} está acoplada a reacciones que proporcionan energía. Se ha aislado en gen que codifica para la proteína que oxida el manganeso a partir de *Leptothrix* y se ha encontrado que reside en la vaina y no dentro de las células. El porqué esta bacteria oxida Mn^{2+} no está claro pero se ha hipotetizado con la idea de que ello resulta en beneficios energéticos o porque el Mn^{4+} que se produce libera ácidos húmico y fúlvico que son nutrientes para crecimiento.

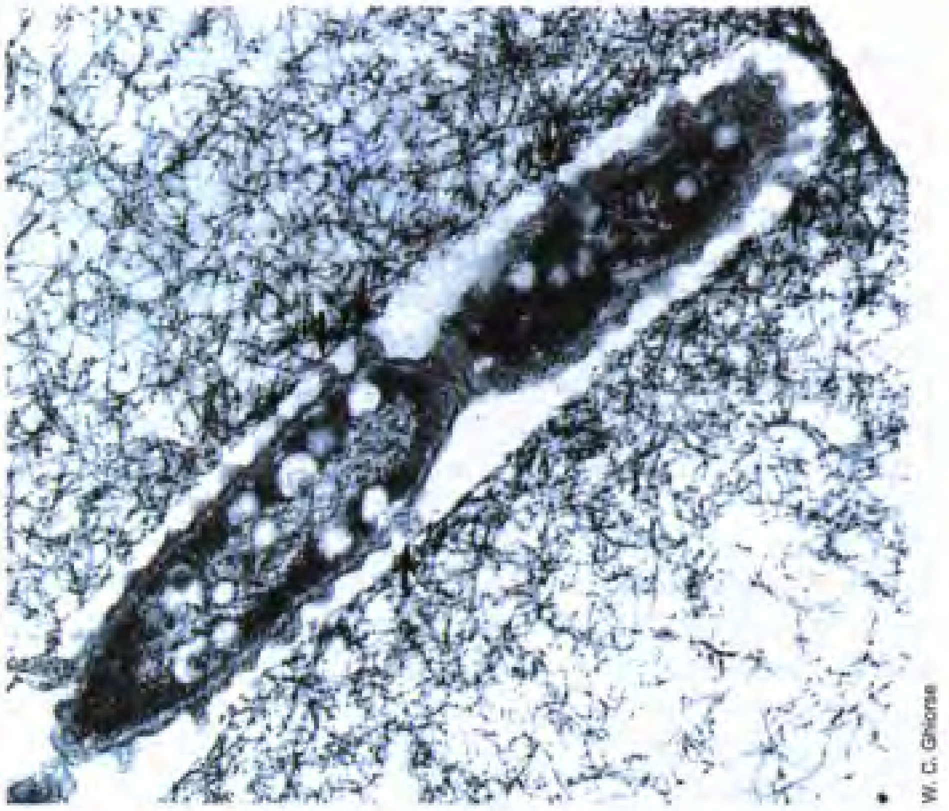

W. C. Ghiorse

Figura 12.36 Micrografía electrónica (corte fino) de *Leptothrix* sp. en una muestra ferromanganésica de un lodazal de Ithaca, New York. Diámetro celular de 0,9 µm. Nótense las protuberancias de la cubierta celular que contactan con la vaina (flechas).

12.16 *Bacteria* pedunculadas/con prostecas y que geman

Géneros clave

Hyphomicrobium
Caulobacter

Éste es un grupo amplio y heterogéneo de Proteobacterias que contiene organismos con varias clases de extrusiones citoplasmáticas: *prostecas, hifas o apéndices* Tabla 12.19). Proyecciones de esta índole (con diámetro inferior a la célula madre), contienen citoplasma y están rodeadas de pared celular y se denominan **prostecas** (Figura 12.37). Es interesante destacar que en este grupo de bacterias la división tiene lugar debido a un *crecimiento celular no balanceado*, al contrario que en una bacteria normal donde la división es por fisión binaria originándose dos células hijas iguales (Figura 12.38). Aquí, la célula madre retiene su identidad después de la división celular. Los géneros de la Tabla 12.19 se pueden observar en la Figura 12.38.

Una diferencia fundamental entre estas bacterias y las convencionales no es la formación de yemas o prostecas, sino la formación de nuevo material celular a partir de un único punto (crecimiento polar) en lugar de en toda la célula (crecimiento intercalar). Algunos géneros que no se consideran bacterias gemantes muestran crecimiento polar sin diferenciación en el tamaño celular (Figura 12.38). Una consecuencia importante del crecimiento polar es que las estructuras internas, tales como los complejos de membranas, no están implicados en los procesos de división celular. De esa manera, se permite la formación de estructuras internas más complejas que en un crecimiento intercalar.

TABLA 12.19 Características de las bacterias pedunculadas, con apéndices (prostecas) y que geman

Característica	Género	Grupo filogenético[a]	DNA (GC mol %)
Bacterias con pedúnculos:			
El pedúnculo es una extensión del citoplasma y está implicada en la división celular	*Caulobacter*	Alfa	62-67
Células fusiformes	*Prosthecobacter*	Alfa	54-60
El pedúnculo es una proyección celular pero sin citoplasma:			
Células vibriodes, el pedúnculo acumula hierro	*Gallionella*	Beta	55
Pedúnculo gelatinoso y lateral, no deposita hierro	*Nevskia*	Gamma	60
Bacterias con apéndices (porstecas):			
Prosteca única o doble	*Asticcacaulis*	Alfa	55-61
Múltiples prostecas			
Prostecas cortas, fisión múltiple, algunas con vesículas de gas	*Prosthecomicrobium*	Alfa	64-70
Células planas, estrelladas, algunas con vesículas de gas	*Stella*	Alfa	69-74
Prostecas largas, gemantes, algunas con vesículas de gas	*Ancalomicrobium*	Alfa	70-71
Bacterias gemantes:			
Fototróficas, producen hifas	*Rhodomicrobium*	Alfa	61-63
Fototróficas, gemantes sin hifas	*Rhodopseudomonas*	Alfa	64-72
Quimioorganotrofas, bacilares	*Blastobacter*	Alfa	59-66
Quimioorganotrofos, gemas en los extremos de las hifas			
Hifas únicas a partir de células parentales	*Hyphomicrobium*	Alfa	59-65
Hifas múltiples a partir de células parentales	*Pedomicrobium*	Alfa	62-67

[a] Todas son Proteobacteria.

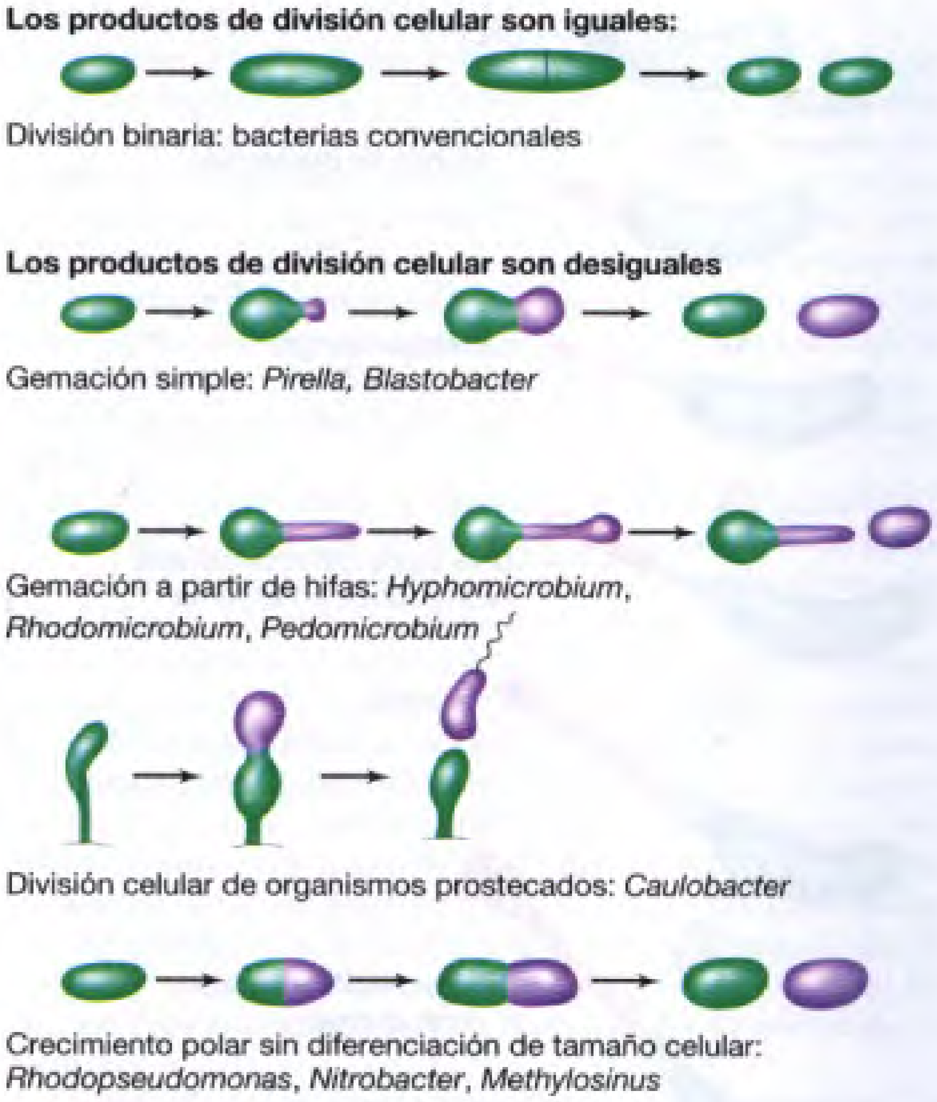
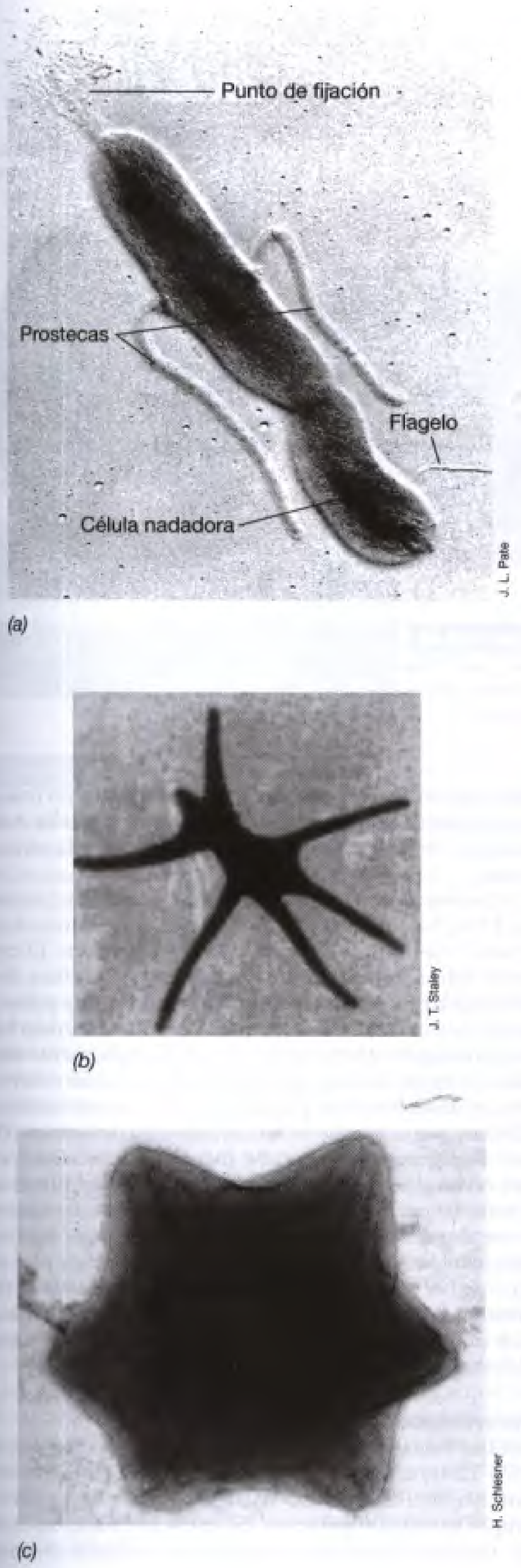

Los productos de división celular son iguales:
División binaria: bacterias convencionales
Los productos de división celular son desiguales
Gemación simple: Pirella, Blastobacter
Gemación a partir de hifas: Hyphomicrobium, Rhodomicrobium, Pedomicrobium
División celular de organismos prostecados: Caulobacter
Crecimiento polar sin diferenciación de tamaño celular: Rhodopseudomonas, Nitrobacter, Methylosinus

Figura 12.38 Diferencia entre la división celular en una bacteria convencional, en una bacteria que gema y en una bacteria pedunculada.

Muchas bacterias que geman, particularmente las especies fototróficas, contienen sistemas membranosos internos muy desarrollados.

Bacterias que geman: *Hyphomicrobium*

Las dos bacterias que geman mejores estudiadas son *Hyphomicrobium*, que es quimioorganotrofo y *Rhodomicrobium*, que es fototrófico; ambos organismos están filogenéticamente relacionados y liberan yemas de los extremos de hifas alargadas. La hifa es una extensión directa de la célula madre (Figuras 12.39 y 12.40*b*) y los representantes de este género poseen pared celular, ribosomas, membranas citoplasmáticas y, ocasionalmente, DNA. El proceso de reproducción en *Hyphomicrobium* se ilustra en la Figura 12.39. La célula


Punto de fijación
Prostecas
Flagelo
Célula nadadora
(a)
(b)
(c)

J. L. Pate

J. T. Staley

H. Schlesner

Figura 12.37 Bacterias con prostecas. (a) Micrografía electrónica (sombreado metálico) de *Asticcacaulis biprosthecum* mostrando la localización de las prostecas. Ancho de la célula de 0,6 µm. Nótense también el material para unión a un soporte y la forma nadadora en fase de desarrollo. (b) Micrografía electrónica (tinción negativa) de la bacteria con prostecas *Ancalomicrobium adetum*. Las prostecas son apéndices celulares pues contienen pared celular y citoplasma y tienen un diámetro de 0,2 µm. (c) Micrografía electrónica de la bacteria estrellada *Stella*. Diámetro de 0,8 µm.

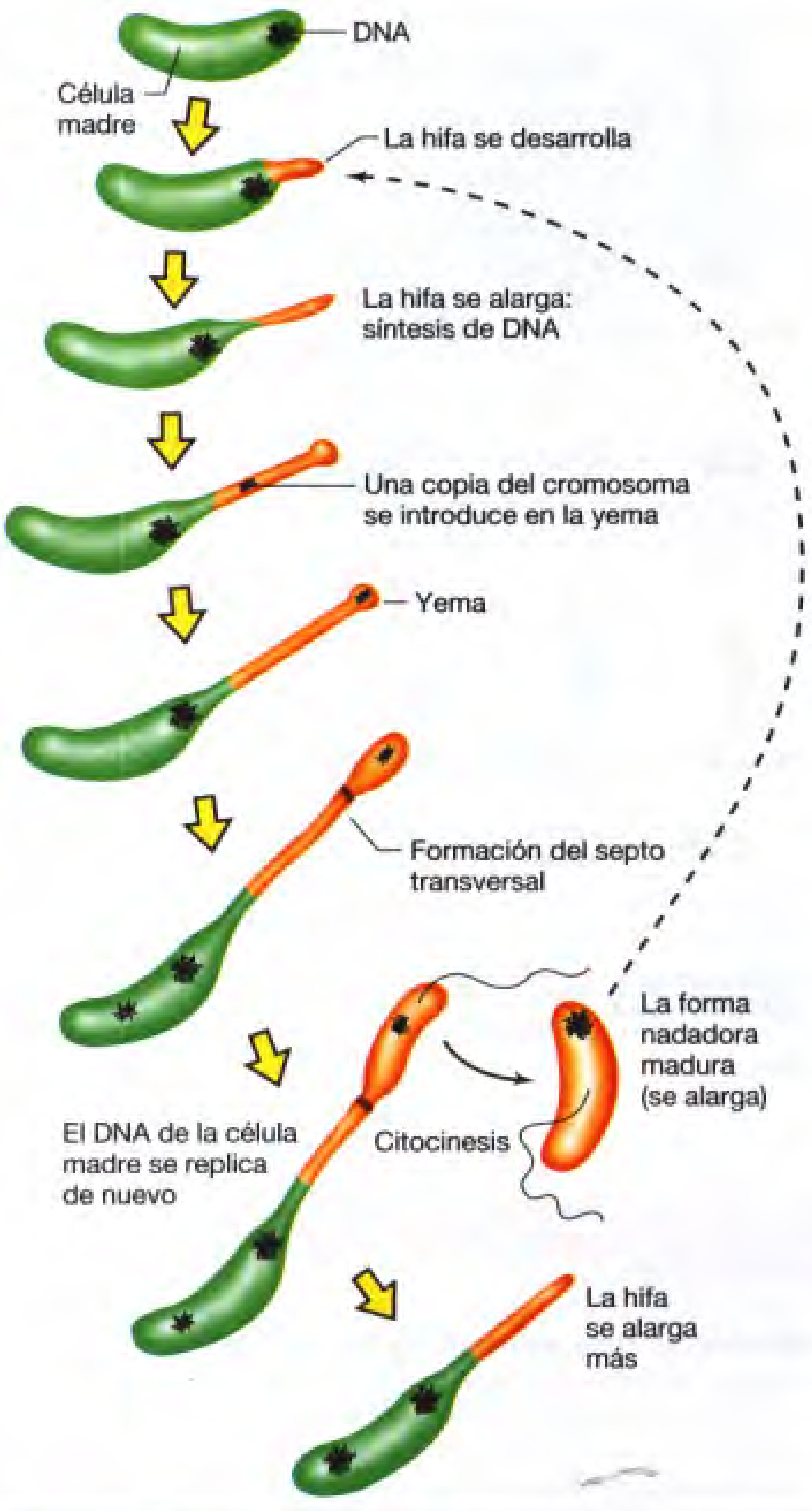

DNA
Célula madre
La hifa se desarrolla
La hifa se alarga: síntesis de DNA
Una copia del cromosoma se introduce en la yema
Yema
Formación del septo transversal
La forma nadadora madura (se alarga)
El DNA de la célula madre se replica de nuevo
Citocinesis
La hifa se alarga más

Figura 12.39 Estadios del ciclo celular de *Hyphomicrobium*. Su único cromosoma es circular.

madre, que a menudo está anclada a un sustrato sólido, germina dando lugar a una proyección fina que se convierte en hifa, formándose una yema en el extremo. Esta yema engrosa, desarrolla un flagelo y se separa de la célula madre. Más tarde, esta forma nadadora pierde su flagelo y después de un periodo de maduración desarrolla la hifa y la yema de nuevo (Figura 12.40*a*). En algunos casos, la yema se origina sin necesidad de pasar por un estadio de hifa, mientras que en otros casos una única célula forma hifas en cada uno de los extremos (Figura 12.40*b*).

Son dignas de mención las etapas que tienen lugar durante la replicación del nucleoide (Figura 12.39). El DNA localizado en la célula madre replica y tan pronto como se forma la yema, una copia del DNA se integra en ella. A continuación, se desarrolla el septo transversal y la célula se separa.

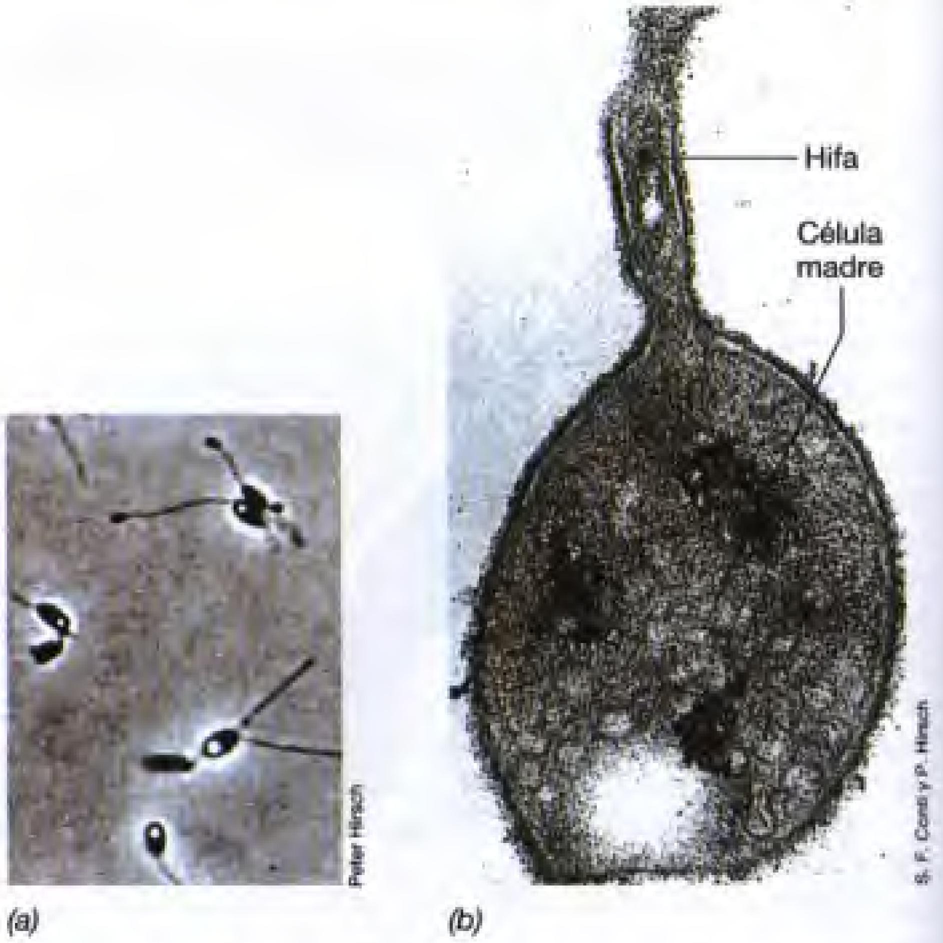

Hifa
Célula madre
Peter Hirsch
S. F. Conti y P. Hirsch
(a)
(b)

Figura 12.40 *Hyphomicrobium*. (a) Micrografía de contraste de fases. Las células miden unos 0,7 µm de diámetro. (b)) Micrografía electrónica (corte fino) de *Hyphomicrobium*. La hifa mide 0,2 µm de diámetro.

Hyphomicrobium es una bacteria metilotrófica (*véase* Sección 12.6). Las fuentes de carbono que mejor utilizan son: metanol, metilamina, formaldehído y formato. El crecimiento sobre acetato, etanol o compuestos alifáticos de cadena más larga, azúcares o aminoácidos es muy pobre. La urea, amidas, nitrato y nitrito pueden utilizarse como fuentes de nitrógeno. *Hyphomicrobium* está ampliamente distribuido en aguas dulces, marinas y en suelos. El cultivo de enriquecimiento inicial puede efectuarse sobre medios inorgánicos que carezcan de fuente orgánica de carbono. Después de algunas semanas de incubación, se siembra en placa en medio con metilamina el material del film de superficie. Se comprueban microscópicamente las colonias que se desarrollan observando la morfología típica de *Hyphomicrobium*. Un enriquecimiento específico para este grupo de bacterias incluye metanol como donador de electrones y nitrato como aceptor en condiciones anóxicas; el único organismo desnitrificante en presencia de metanol es *Hyphomicrobium*.

Bacterias con prostecas

Estas bacterias son quimioorganotrofos aerobios (Figuras 12.37 y 12.41) que se fijan a pequeñas partículas, material de plantas o, incluso, a otras bacterias en medios acuáticos. Aunque la función principal de estos apéndices es la fijación, también sirven para incrementar sustancialmente la

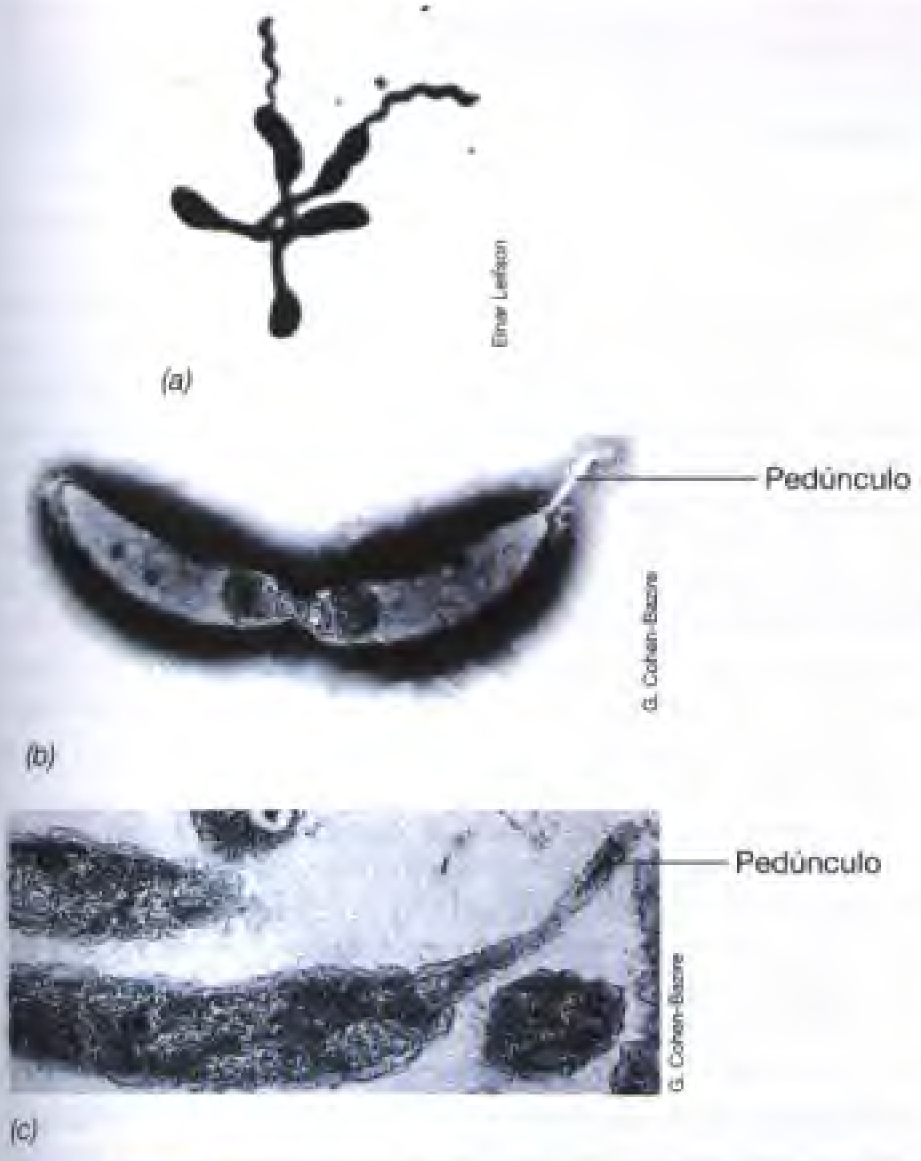


Figura 12.41 Bacterias pedunculadas. (a) Una roseta de *Caulobacter*. Diámetro celular de 0,5 µm. Las 5 células están unidas por sus prostecas. Dos de las células se han dividido y las células hijas han desarrollado flagelos. (b, c) Micrografía electrónica de *Caulobacter*. (b) Tinción negativa de una célula en división. (c) Cortes finos. Nótese que la región prostecada contiene material celular.

relación superficie/volumen (recuérdese el Capítulo 4) que una relación alta confiere a pequeñas células, como las bacterias, una gran capacidad de tomar nutrientes y excretar productos de desecho. La morfología poco habitual de estas bacterias (Figura 12.37) lleva este concepto a una situación extrema y puede significar la adaptación a condiciones particularmente oligotrofas de las aguas que normalmente habitan. El aislamiento selectivo de estas bacterias puede conseguirse mezclando un inóculo con una solución nutritiva muy diluida, como por ejemplo 0,01% de peptona. Al cabo de unos días, se desarrolla un film sobre la superficie que contiene estas bacterias.

Otra función de la prosteca puede ser la de disminuir la tasa de sedimentación en medios acuáticos. Se ha demostrado que la centrifugación de células prostecadas, en el laboratorio, requiere mayor fuerza centrífuga que las no prostecadas. Esta tendencia inherente a flotar es debida, probablemente, a la prosteca y su posesión puede significar una ventaja ecológica. Debido a que estos organismos son aerobios estrictos, la prosteca puede impedir su hundimiento hacia zonas anóxicas de sus hábitat respectivos donde serían incapaces de respirar.

Caulobacter y *Gallionella*

Dos bacterias muy representativas de este grupo son *Caulobacter* (Figura 12.41) y *Gallionella* (Figura 12.43). El primero es un quimioorganotrofo que produce una prosteca rellena de citoplasma, mientras que el segundo es un quimiolitotrofo oxidante de hierro, cuya prosteca está compuesta de hidróxido férrico. *Caulobacter* suele encontrarse en la superficie de objetos unidas a varias células por su prosteca formando estructuras en *roseta* típicas (Figura 12.41*a*). Al final de la prosteca hay una especie de ventosa o *estructura de adherencia* (*holdfast*) que es utilizada para la fijación a las superficies.

El ciclo de división celular de *Caulobacter* (Figura 12.42) es de especial interés, en tanto en cuanto implica procesos de división binaria asimétrica y se ha estudiado mucho para llegar a entender su división y control de desarrollo celular. La división de una célula prostecada ocurre mediante elongación celular seguida de una fisión; en el extremo y opuesto a la prosteca, se desarrolla un flagelo. La forma flagelada polar y nadadora se separa de la célula madre y se fija a un nuevo soporte, previa perdida del flagelo y síntesis de una nueva prosteca (Figura 12.42). Por tanto la prostecación es un proceso precursor de la división celular y está coordinada con la síntesis de DNA (Figura 12.42). El ciclo de división celular en *Caulobacter* es, por todo lo expuesto, más complejo que en bacterias de división binaria simple.

Otro microorganismo interesante de este grupo es *Gallionella* que origina apéndices retorcidos de hidróxido férrico (Figura 12.43). Sin embargo, estas estructuras no son parte integral de la célula, sino que son excretadas a partir de la superficie celular. Contiene una matriz orgánica en la que se acumula el hidróxido férrico. *Gallionella* se aísla frecuentemente en arroyos ferrugíneos o en hábitat en los que abunda el ion Fe^{2+}, por lo general, acompañando a *Sphaerotilus*. *Gallionella* es un quimiolitotrofo autotrófico y contiene las enzimas del ciclo de Calvin (*véase* Sección 17.6), por el que el CO_2 es incorporado en material celular utilizando el ion ferroso como donador de electrones.

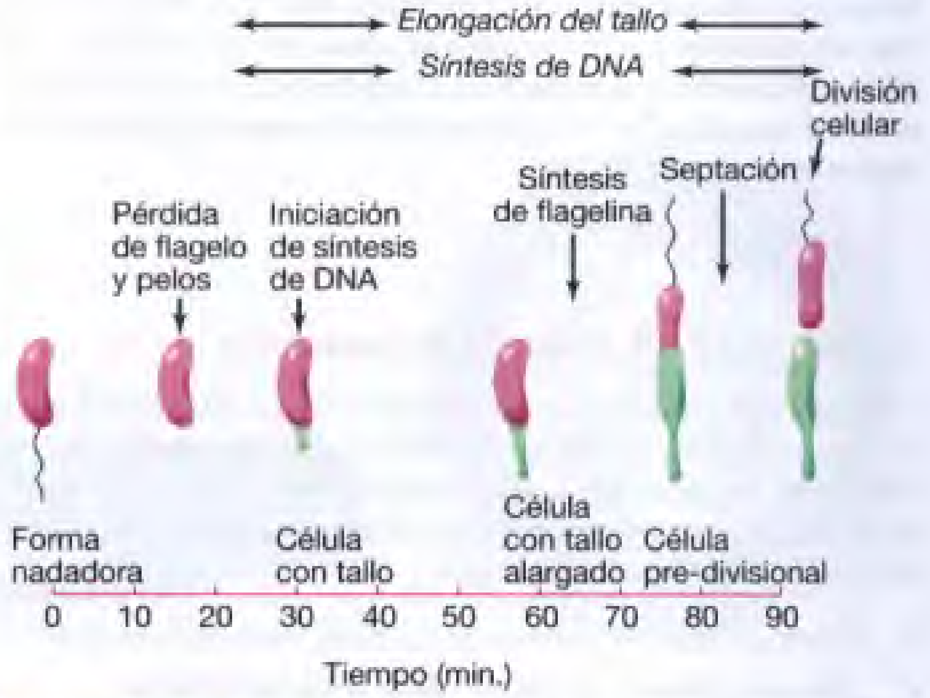


Figura 12.42 Estadios del ciclo celular de *Caulobacter* comenzando con una célula nadadora.

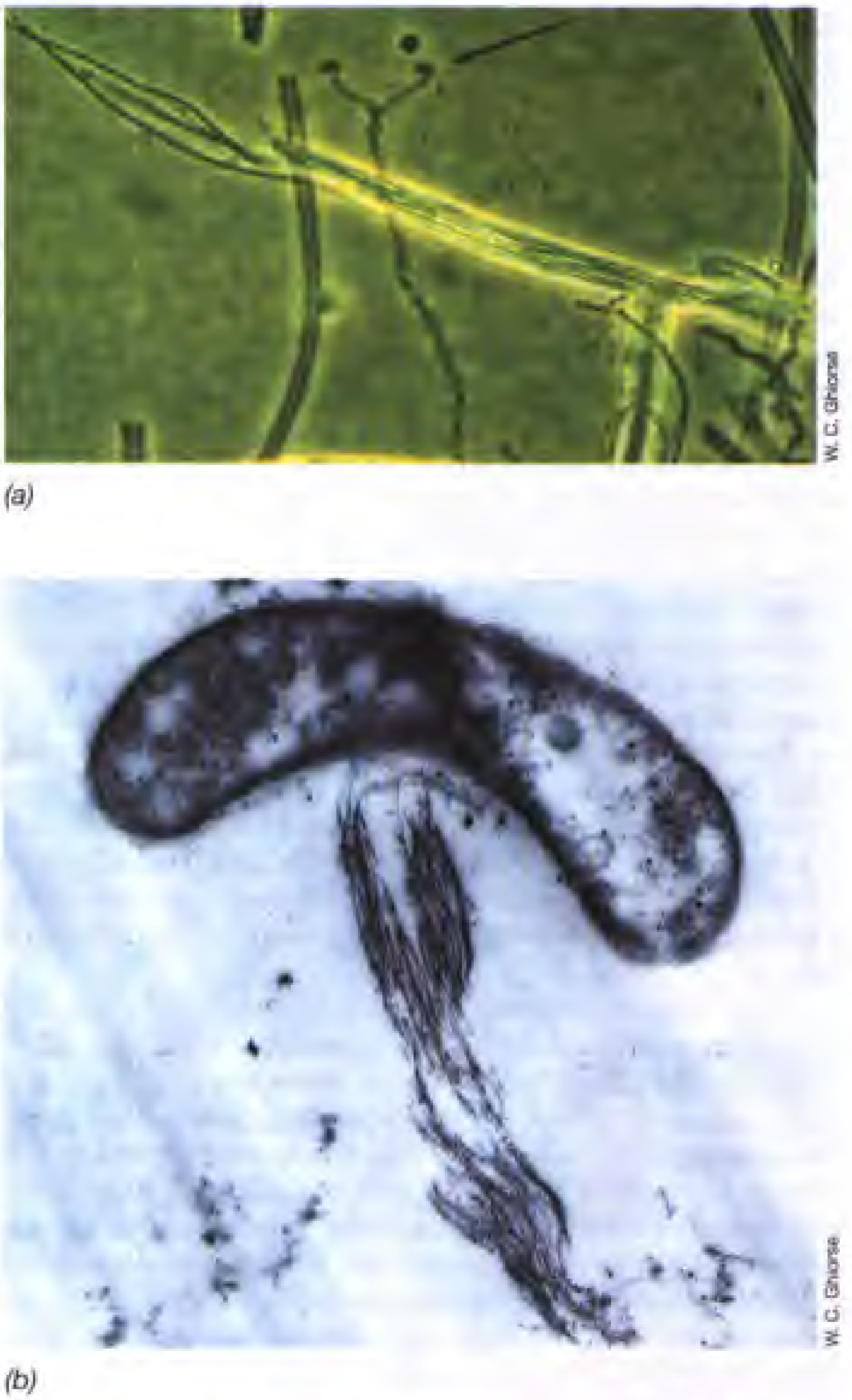


Figura 12.43 *Gallionella ferruginea*. (a) Micrografía de células aisladas de un efluente férrico cerca de Ithaca, New York. Nótese las formas entrelazadas que llevan hasta la célula arriñonada (flecha). (b) Micrografía electrónica (corte fino). Diámetro celular de 0,6 μm. Nótense los apéndices de hidróxido férrico que emanan del centro de las células en ambas fotografías.

✓ 12.15-12.16 Revisión de conceptos

Las bacterias envainadas son Proteobacterias filamentosas en las que las células individuales forman cadenas dentro de una vaina. Las bacterias gemantes y prostecadas utilizan los apéndices para fijarse a sustratos o para la absorción de nutrientes y son fundamentalmente acuáticos.

- ✓ Fisiológicamente, ¿qué es único de la bacteria *Leptothrix?*
- ✓ ¿En qué difiere la gemación de la división binaria?
- ✓ ¿Qué ventaja puede tener un organismo prostecado en un ambiente pobre en nutrientes?

12.17 Mixobacterias deslizantes

Géneros clave

Myxococcus
Stigmatella

Existe un grupo de procariotas que tienen una forma de movilidad por *deslizamiento*. En la Sección 4.11 ya se discutió este proceso. Las bacterias deslizantes son generalmente bacilos largos o filamentos, carecen de flagelos, pero son capaces de moverse al contactar con superficies sólidas. Un grupo de estas bacterias —las mixobacterias fructificantes o fruticosas— posee la interesante propiedad de formar estructuras multicelulares que denominamos **cuerpos fructíferos** y de poseer un ciclo celular complejo que implica comunicación intercelular (*véase* Figura 12.47). Filogenéticamente, las mixobacterias fruticosas son miembros de la subdivisión delta de las Proteobacterias (Tabla 12.20).

Poseen los modelos de comportamiento y ciclos de vida más complejos del mundo procariótico. Por ello, su cromosoma es más grande de lo normal. *Myxococcus xanthus*, por ejemplo, posee un cromosoma circular de 9500 kilopares de bases, o lo que es lo mismo, dos veces del *E. coli* (*véase* Sección 10.12); de hecho, son dos tercios del de *Saccharomyces cerevisiae* cuyo genomio está disperso en 16 cromosomas (*véase* Sección 14.6). Las células vegetativas de las mixobacterias fruticosas son simples bacilos Gram negativos no flagelados (Figura 12.44*a*) que se desplazan por superficies y obtienen su sustento de lisar otras bacterias. En condiciones apropiadas, las formas móviles se agregan para formar *cuerpos fructíferos*, dentro de los cuales algunas células se diferencian y convierten en formas de resistencia denominadas **mixosporas** (Figura 12.44*b*).

Los cuerpos fructificantes de las mixobacterias varían desde simples formas globosas, formadas por mixosporas mantenidas unidas por una capa mucilaginosa, hasta formas más diferenciadas con un pedúnculo y pared del cuerpo fructífero (Figura 12.45). A menudo son coloreadas (Figuras 12.45 y 12.46) y se pueden ver con una simple lupa creciendo a expensas de material vegetal en descomposición. Frecuentemente, se desarrollan en deposiciones de animales, como por ejemplo de los conejos, después de ser incubado durante unos días en cámara húmeda. Otra forma de aislarlas es preparando placas de Petri con agar al 1,5% en agua, sin más nutrientes y encima se deposita una suspensión densa de cualquier bacteria. En el centro se deposita un trozo de corteza de árbol en descomposición. Las mixobacterias presentes lisan la bacteria que se puso y utilizan el material intracelular como nutriente; a medida que crecen, van reptando a través de la placa. Después de algunos días, o una semana, se pueden ver los cuerpos fructíferos. Basta ahora tomar las mixosporas para así obtener un cultivo puro de mixobacterias. Muchas mixobacterias se pueden crecer en el laboratorio en medios, con peptona o casitona, que les proporciona aminoácidos y pequeños péptidos que requieren para crecer. Estos microorganismos son aerobios

TABLA 12.20 Clasificación de mixobacterias fructificantes[a]

Características	Género	DNA (GC mol %)
Células vegetativas fusiformes:		
Mixosporas esféricas u ovales, cuerpos fructíferos normalmente blandos y resbaladizos sin esporangios bien definidos o tallos	*Myxococcus*	68-71
Mixosporas bacilares:		
Las mixosporas no están incluidas en esporangios y cuerpos fructíferos sin tallos	*Archangium*	67-68
Mixosporas embebidas en cubierta mucosa:		
Cuerpos fructíferos sin tallos	*Cystobacter*	68
Cuerpos fructíferos con tallos; esporangios únicos	*Melittangium*	—
Cuerpos fructíferos con tallos; esporangios múltiples	*Stigmatella*	68-69
Cuerpos fructíferos de color marrón oscuro que contienen esporangios esféricos o en forma de disco con una pared externa	*Angiococcus*	—
Células vegetativas no fusiformes con extremos redondeados; las mixosporas se parecen a células vegetativas; siempre hay esporangios:		
Cuerpos fructíferos sin tallos; mixosporas bacilares	*Polyangium*	69
Cuerpos fructíferos sin tallos; mixosporas ovales; muy celulolíticos	*Sorangium*	—
Cuerpos fructíferos sin tallos; mixosporas cocoides	*Nannocystis*	70-72
Cuerpos fructíferos con tallo	*Chondromyces*	69-70

[a] Filogenéticamente las especies examinadas pertenecen a la subdivisión delta de Proteobacteria (*véase* Tabla 12.1).

típicos con ciclo del ácido cítrico completo y sistema citocrómico.

Ciclo celular de una mixobacteria fructificante

El ciclo de vida de una mixobacteria fruticosa típica se puede observar en la Figura 12.47. La célula vegetativa excreta moco y a medida que se mueve por una superficie sólida deja un rastro de esta sustancia tras de sí (Figura 12.48*a*). Esta pista es utilizada por otras células que vienen detrás de modo que pronto se reconoce un modelo de pistas irradiando de un punto (Figura 12.48*b*). El cuerpo fructífero formado (Figuras 12.45 y 12.46) es una estructura compleja, originado por la diferenciación de células que originan el tallo y la cabeza portadora de las mixosporas.

La formación del cuerpo fructífero no ocurre si existen nutrientes para el crecimiento vegetativo, pero al acabarse éstos, comienza el proceso fructificante. Las células se agregan, presumiblemente a través de un proceso quimiotáctico, y las células se dirigen unas hacia otras formando montones (Figura 12.49); de forma que un único cuerpo fructífero puede tener 10^9 células, o incluso más. A medida que aumenta el tamaño del montón celular, comienza la diferenciación del futuro tallo y cabeza (Figura 12.49*b* y *c*). La Figura 12.49*d* ilustra claramente la diferenciación de un cuerpo fructífero en tallo y cabeza. El tallo se compone fundamentalmente de moco que puede atrapar unas pocas células. La mayoría están en la cabeza y se diferencian hasta *mixosporas* (Figuras 12.44-12.47). En algunos géneros, las mixosporas están encerradas en estructuras grandes llamados **cistos**. Comparadas con las células vegetativas, las mixosporas son más resistentes a la radiación ultravioleta, la temperatura (muy inferior a una endospora típica), la desecación y los ultraso-

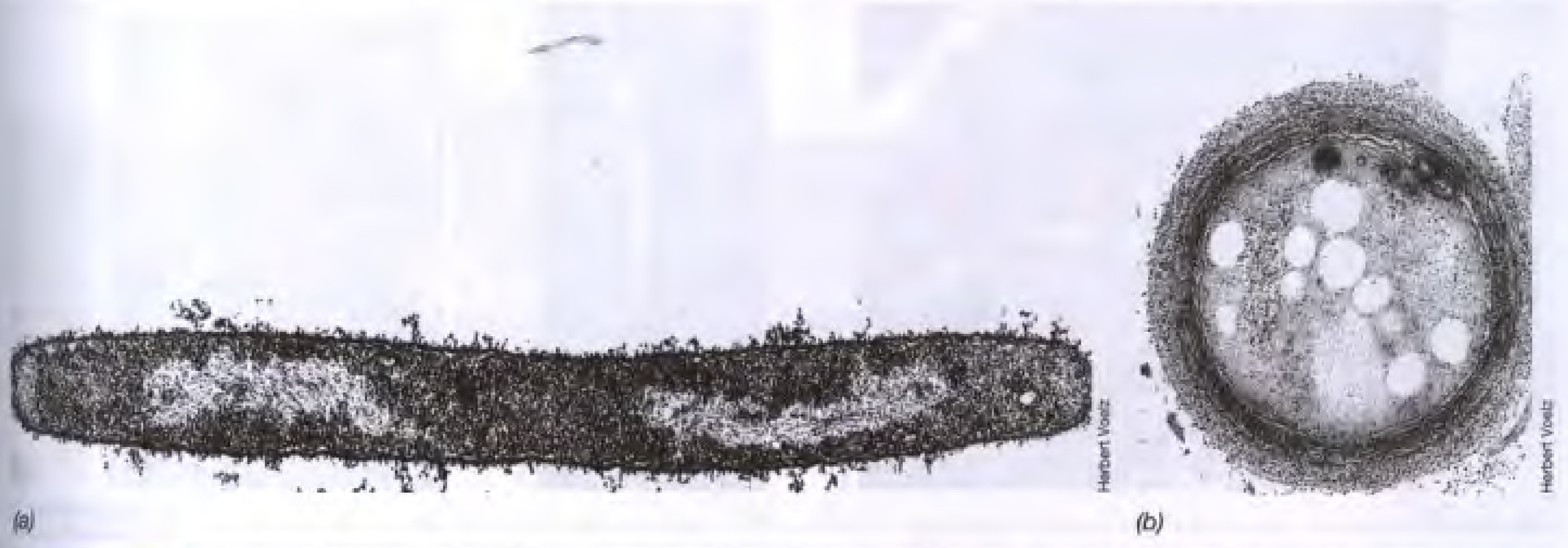
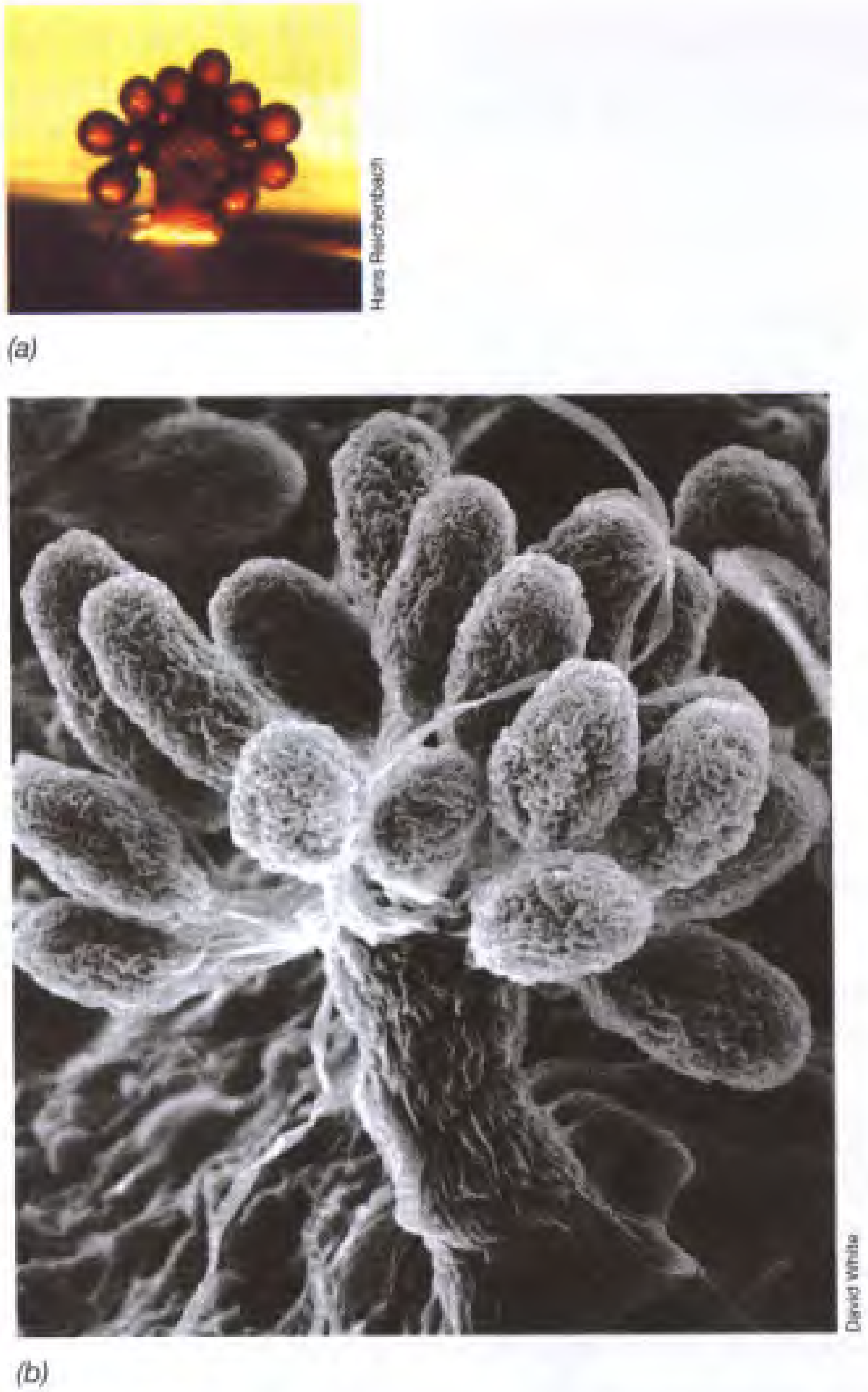


Figura 12.44 (a) Micrografía electrónica (corte fino) de una célula vegetativa de *Myxococcus xanthus*. Diámetro celular de 0,75 µm (b) Mixospora de *M. Xanthus* mostrando la pared externa en multicapas. Las mixosporas miden aproximadamente 2 µm de diámetro.



Hans Reichenbach

David White

Figura 12.45 *Stigmatella aurantiaca*. (a) Cuerpo fructífero aislado. La estructura tiene 150 µm de alto. (b) Micrografía electrónica de barrido de un cuerpo fructífero sobre un pedazo de madera. Nótense las células individuales visibles en la estructura.

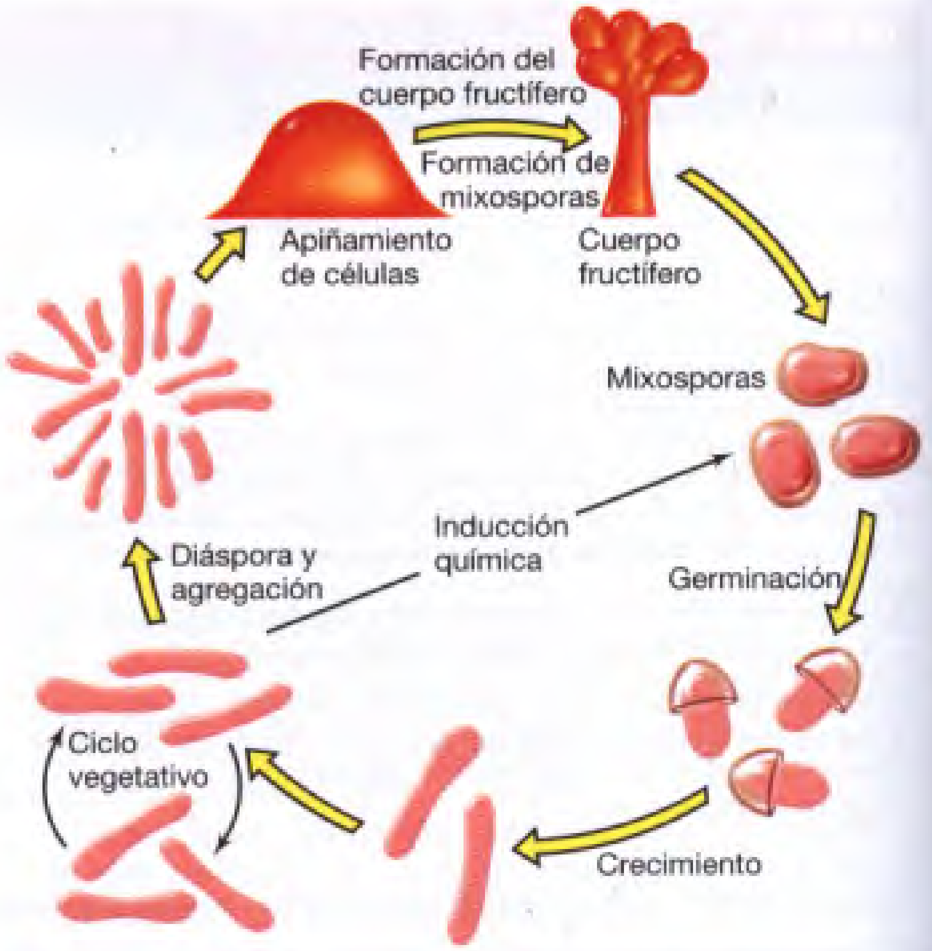
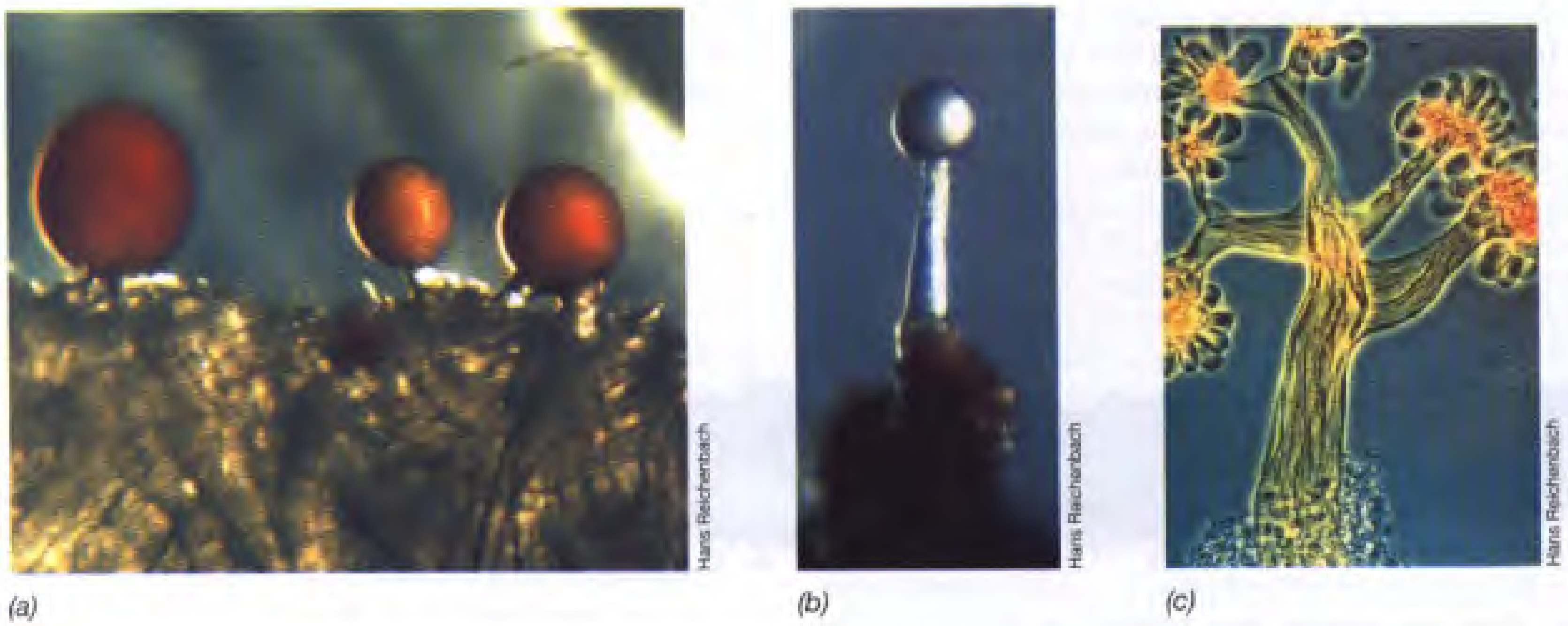

Formación del cuerpo fructífero
Formación de mixosporas
Apiñamiento de células
Cuerpo fructífero
Mixosporas
Inducción química
Diáspora y agregación
Germinación
Ciclo vegetativo
Crecimiento

Figura 12.47 Ciclo biológico de *Myxococcus xanthus*. La agregación sirve para agrupar las células vegetativas para la formación de un cuerpo fructífero. Las células vegetativas sufren un proceso morfogenético hasta dar lugar a células de resistencia o mixosporas. Estas, cuando las condiciones son favorables, germinan par dar de nuevo las células vegetativas. Las células vegetativas pueden convertirse directamente en mixosporas sin la formación previa de los cuerpos fructíferos bajo la acción de ciertos compuestos químicos (altas concentraciones de glicerol). Véanse las fotografías de los cuerpos fructíferos de *Myxococcus* en las Figuras 12.45 y 12.46.

nidos. Parece que la principal función es la de resistir la desecación en periodos secos de los hábitat respectivos. En condiciones favorables, las mixosporas germinan por un punto concreto de la cubierta, emergiendo un bacilo típico.



Hans Reichenbach

Hans Reichenbach

Hans Reichenbach

Figura 12.46 Cuerpos fructíferos de cuatro especies de mixobacterias. (a) *Myxococcus fulvus* (125 µm de alto). (b) *Myxococcus stipitatus* (170 µm de alto). (c) *Mellitangium erectum* (50 µm de alto). (d) *Chondromyces crocatus* (560 µm de alto).

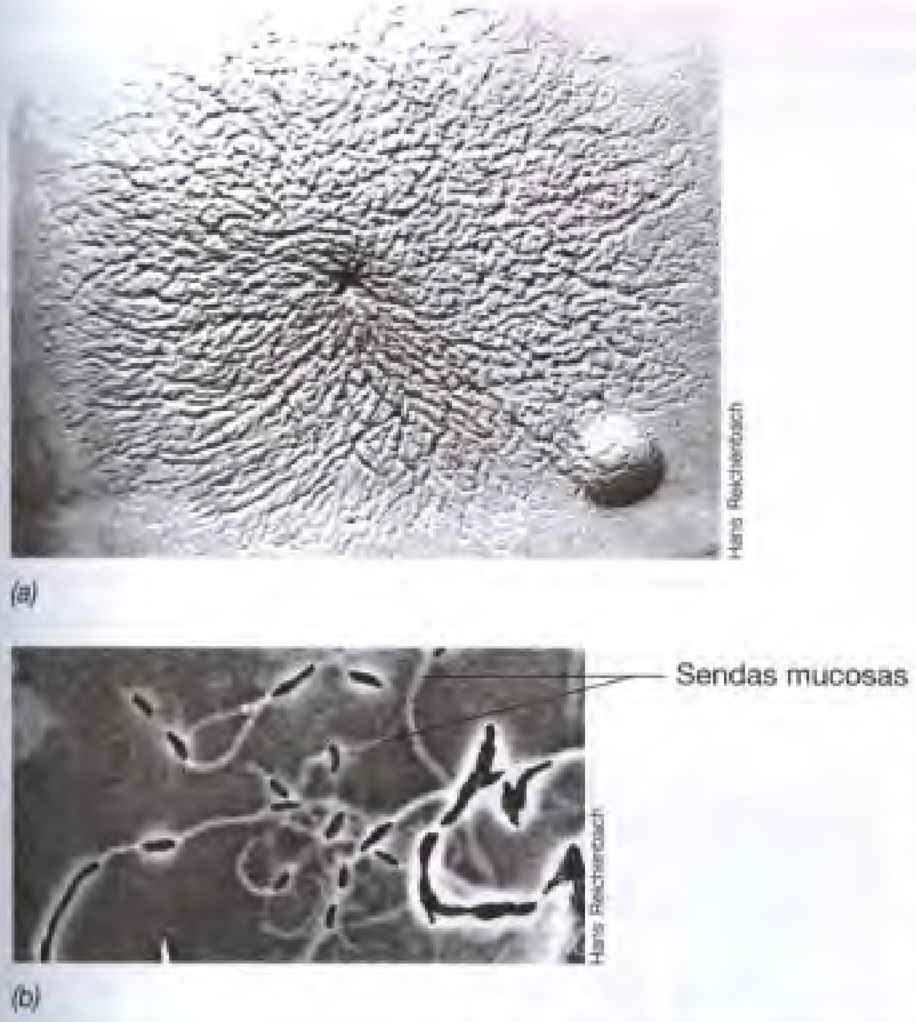


Figura 12.48 (a) Micrografía de una colonia móvil (9 mm de diámetro) de *Myxococcus xanthus* sobre agar. (b) Células de *M. fulvus* en fase activa de deslizamiento. Nótense las sendas dejadas sobre la superficie del agar. Diámetro celular 0,8 µm.

Las mixobacterias poseen casi siempre color amarillo debido a los pigmentos carotenoídicos (*véase* Figuras 12.45*a* y 12.46). La formación de los pigmentos es favorecida por la luz y, al menos, una de las funciones es la de fotoprotección. Ya que en la naturaleza las mixobacterias forman cuerpos fructíferos en presencia de luz, esta función parece lógica. En el género *Stigmatella* (Figura 12.45), la luz favorece el desarrollo de los cuerpos fructificantes y cataliza la formación de una feromona lipídica denominada 2,5,8-trimetil-8-hidroxi-nonano-4-ona, responsable de iniciar el proceso de agregación. Las mixobacterias fruticosas se clasifican primariamente sobre la base de su morfología utilizando características de las células vegetativas, de las mixosporas y de la estructura del cuerpo fructífero (Tabla 12.20).

✓ 12.17 Revisión de conceptos

Las mixobacterias fruticosas son bacilos con movilidad deslizante que se agregan para formar masas complejas celulares denominadas *cuerpos fructíferos*. Son bacterias quimioorganotrofas del suelo que viven de consumir materia orgánica en descomposición o de otras bacterias.

- ✓ ¿Qué dispara la formación de cuerpos fructíferos en las mixobacterias?
- ✓ ¿Qué es una mixospora y cómo se compara con una endospora?
- ✓ ¿A qué grupo filogenético pertenecen las mixobacterias?

12.18 Proteobacterias reductoras del sulfato y del azufre

Géneros clave

Desulfovibrio
Desulfobacter
Desulfuromonas

Tanto el sulfato (SO_4^{2-}) como el azufre (S^0) funcionan como aceptores de electrones bajo condiciones anóxicas en un gran grupo de Proteobacterias que utilizan compuestos orgánicos H_2 como donadores de electrones; el ácido sulfídrico (H_2S) es el producto final de la reducción del SO_4^{2-} y del S^0. Más de 20 géneros, que colectivamente se conocen como las reductoras desasimilatorias de sulfato o azufre, están bien caracterizados y se recogen en la Tabla 12.21. Los géneros en el Grupo I, tales como *Desulfvibrio* (Figura 12.50*a*), *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum* y *Desulfolobus* (Figura 12.50*c*), utilizan lactato, piruvato, etanol o ciertos ácidos grasos como donadores de electrones, reduciendo así el sulfato hasta sulfuro. Los géneros en el Grupo II, tales como *Desulfobacter* (Fi-

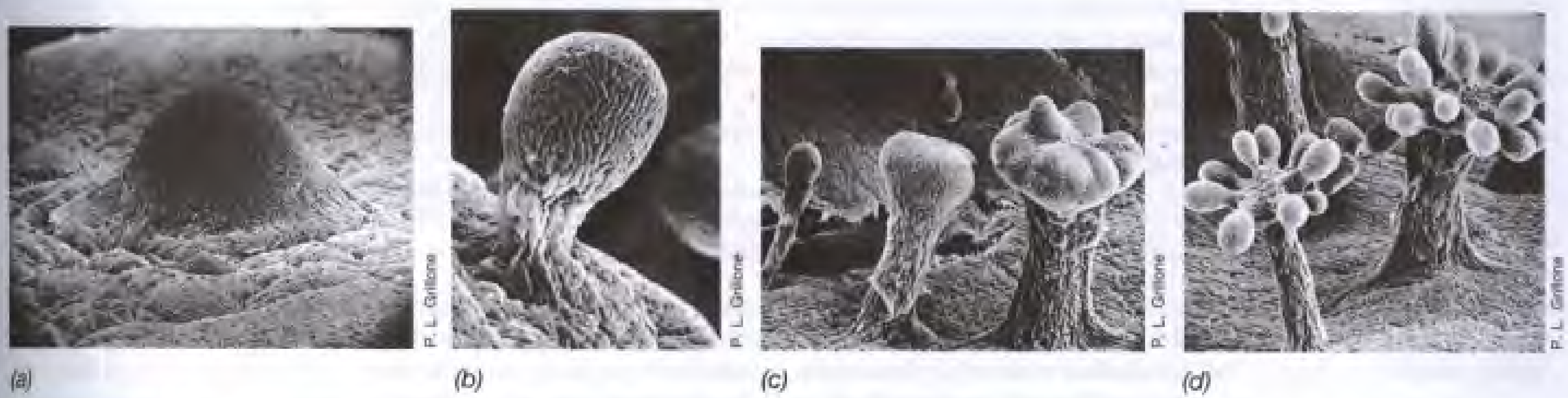


Figura 12.49 Micrografía electrónica de barrido de la formación de cuerpos fructíferos de *Chondromyces crocatus*. (a) Estadio inicial mostrando la agregación celular. (b) Fase inicial de la formación del pedúnculo o soporte. La formación de moco en el extremo no ha comenzado todavía de modo que aun se ven las células individualizadas. (c) Tres fases en la formación de la cabeza. Nótese que el grosor del pedúnculo también aumenta. (d) Cuerpos fructíferos maduros. La altura total es de unos 600 µm. (*véase* Figua 12.46c).

TABLA 12.21 Características de las bacterias reductoras de sulfato y de azufre[a]

Género	Características	DNA (GC mol%)
Grupo I, reductores de sulfato: no oxidan acetato		
Desulfovibrio	Flagelación polar, bacilos curvos, no esporulados; Gram negativo, contiene desulfoviridina; doce especies de las cuales una es termofílica	46-61
Desulfomicrobium	Bacilos móviles no esporulados; Gram negativos, no poseen desulfoviridina; tres especies	52-57
Desulfobotulus	Vibrios; Gram negativos; móviles; no poseen desulfoviridina; una especie	53
Desulfofustis	Bacilos móviles especializado en la degradación del glicolato y del glioxalato	56
Desulfotomaculum	Bacilos rectos o curvos; móviles por flagelos perítricos; Gram negativos; desulfoviridina ausente; produce endosporas; cuatro especies, una es termofílica y otra es capaz de utilizar acetato como fuente de energía	37-46
Desulfomonile	Bacilos capaces de reducir el 3-clorobenzoato a benzoato (*véase* Sección 17.18)	49
Desulfobacula	Células ovales o cocoides, marinas; pueden oxidar varios compuestos aromáticos incluyendo el tolueno hasta CO_2; una especie	42
Archaeoglobus	Arquea termófila, temperatura óptima de 83°C; contiene coenzimas únicas de las metanobacterias; genera pequeñas cantidades de metano; utiliza como donadores de electrones H_2, formato, glucosa, lactato y piruvato. Los aceptores de electrones son SO_4^{2-}, $S_2O_3^{2-}$, o SO_3^{2-}, dos especies (*véase* Sección 13.7)	41-46
Desulfobulbus	Ovoide o forma de limón, sin esporas y Gram negativas; desulfoviridina ausente; cuando son móviles se desplazan mediante un flagelo polar único; utiliza propionato como donador de electrones siendo el acetato y el + CO_2 los productos finales; tres especies	59-60
Desulforhopalus	Curvados con vesículas de gas, psicrófilos, utiliza propionato, lactato o alcoholes como donadores de electrones	48
Thermodesulfobacterium	Bacilos pequeños Gram negativos; desulfoviridina presente; termofílicos; crecimiento óptimo a 70°C; es un miembro de *Bacteria* pero contiene lípidos con enlaces éter (*véase* Sección 12.36)	34
Grupo II, reductores de sulfato: oxidan acetato		
Desulfobacter	Bacilos Gram negativos no esporulados; sin desulfoviridina; si se mueven se desplazan mediante un flagelo polar único; utiliza el acetato como donador de electrones y lo oxida hasta CO_2 a través del ácido cítrico. Cuatro especies	45-46
Desulfobacterium	Bacilos, algunos con vesículas de gas, marinas, capaces de crecimiento autotrófico vía acetil-CoA. Tres especies	41-59
Desulfococcus	Células esféricas; inmóviles; Gram negativas; desulfoviridina presente; no esporulado; utiliza desde C_1 hasta C_{14} como donadores de electrones con oxidación completa hasta CO_2; capaces de crecimiento autotrófico a través de la ruta de acetil-CoA; dos especies	57
Desulfonema	Bacteria deslizante de filamentos largos; Gram positivas no esporuladas; con o sin desulfoviridina; utiliza desde C_2 hasta C_{12} (ácidos grasos) como donadores de electrones y los oxidan por completo hasta CO_2; capaces de realizar crecimiento autotrófico a través de la ruta ce acetil-CoA (H_2 como donador de electrones); dos especies	35-42
Desulfosarcina	Células en paquetes cúbicos (agrupación sarcina); Gram negativos sin esporas; desulfoviridina ausente; utiliza ácidos grasos C_2 hasta C_{14} como donadores de electrones con oxidación completa hasta CO_2; capaces de crecimiento autotrófico a través de la ruta de acetil-CoA (H_2 como donador de electrones); una especie	51
Desulfoarculus	Vibrios; Gram negativos, móviles; desulfoviridina ausente; utilizan ácidos grasos C_1 hasta C_{18} como donadores de electrones	66
Desulfacinum	Células cocoides u ovales; Gram negativas; nutricionalmente muy diversos; utilizan ácidos grasos C_1 hasta C_{18} con oxidación completa hasta CO_2 capaces de crecimiento autotrófico; termófilo	64
Desulforhabdus	Bacilo no esporulado; Gram negativas inmóviles; utiliza ácidos grasos con oxidación completa hasta CO_2	52
Thermodesulforhabdus	Bacilos móviles Gram negativos; termófilos; usan ácidos grasos de hasta C_{18}	51
Reductores de azufre por desasimilación		
Desulfuromonas	Bacilos rectos, flagelo único lateral; no esporulado; Gram negativo; no reduce el sulfato; el acetato, succinato, etanol o propanol pueden ser utilizados como donadores de electrones; anaerobio estricto; cuatro especies de las cuales al menos una es capaz de metabolizar el tricloroetileno (*véase* Sección 17.18)	50-63
Desulfurella	Bacilos cortos móviles; Gram negativos; requieren acetato y son termofílicos	31
Sulfurospirillum	Pequeños vibrios, reducen S^0 con el H_2 o el formato como donadores de electrones	—
Campylobacter	Bacilos vibrioides curvados; con flagelos polares; Gram negativos no esporulados; incapaces de reducir sulfato pero pueden reducir anaeróbicamente azufre, sulfito, tiosulfato, nitrato o fumarato, a la vez que utilizan el acetato o una gran diversidad de compuestos carbonados como donadores de electrones; son aerobios facultativos	40-42

[a] Filogenéticamente, la mayoría de las bacterias reductoras de azufre son de la subdivisión delta de Proteobacteria.

gura 12.50*d*), *Desulfococcus*, *Desulfosarcina* (Figura 12.50*e*) y *Desulfonema* (Figura 12.50*b*), se han especializado en la oxidación de ácidos orgánicos, particularmente el acetato, reduciendo sulfato a sulfuro. Las bacterias reductoras de sulfato son anaerobios estrictos y para cultivarlas se tienen que emplear técnicas estrictamente anóxicas. Se encuentran ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos y terrestres que se vuelven anóxicos debido a procesos microbianos de descomposición. El género mejor estudiado es *Desulfovibrio* (Figura 12.50*a*), que es común en hábitat acuáticos o en suelos encharcados con abundante materia orgánica y suficientes niveles de sulfato. *Desulfotomaculum*, filogenéticamente un miembro de las *Bacteria* Gram positivas, son bacilos formadores de endosporas que se encuentran principalmente en el suelo. El crecimiento y la reducción del sulfato por parte de *Desulfotomaculum* en determinados productos enlatados dan lugar a alteraciones típicas con olor a *ácido sulfídrico*. El resto de las bacterias reductoras de sulfato son indígenas de ambientes acuáticos, tanto dulce, como salados y ocasionalmente se les puede aislar del intestino de los mamíferos.

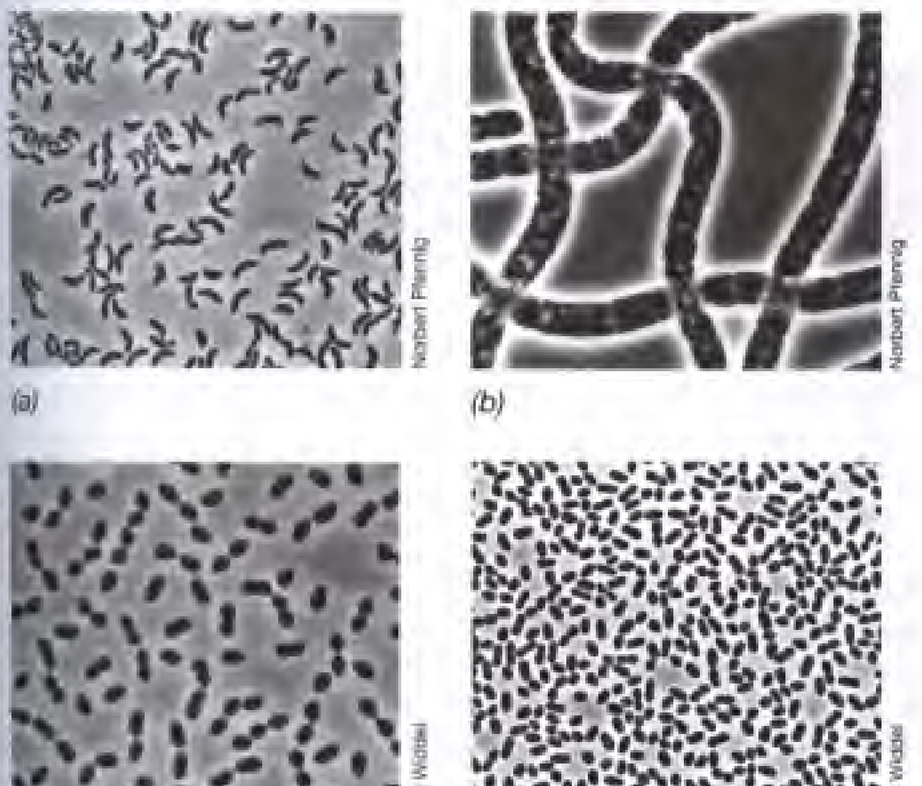


Figura 12.50 Micrografía de contraste de fases de (a-e) bacterias representantes reductoras de sulfato y (f) reductoras de azufre. (a) *Desulfovibrio desulfuricans;* diámetro celular de 0,7 µm. (b) *Desulfonema limicola*; diámetro celular de 3 µm. (c) *Desulfobulbus propionicus*; diámetro celular de 1,2 µm. (d) *Desulfobacter postgatei*; diámetro celular de 1,5 µm. (e) *desulfosarcina variabilis* (microscopía de interferencia); diámetro celular de 1,25 µm. (f) *Desulfuromonas acetoxidans*; diámetro celular de 0,6 µm.

Reducción de azufre

Los reductores de azufre vía desasimilación, transforman el azufre elemental hasta ácido sulfídrico pero son incapaces de reducir el sulfato hasta sulfuros. Miembros del género *Desulfuromonas* (Figura 12.50*f*) pueden crecer anaeróbicamente, acoplando la *oxidación* del sustrato tal como acetato o etanol a la *reducción* del azufre elemental, hasta sulfuro. Sin embargo, esta propiedad, así como la de reducción de otros compuestos como el tiosulfato, sulfito o dimetilsulfóxido (DMSO), es una propiedad extendida en un grupo de quimioorganotrofos, generalmente anaerobios facultativos (por ejemplo, *Proteus, Campylobacter, Pseudomonas y Salmonella*). *Desulfuromonas* difiere de este último género en que es completamente anaerobio y utiliza solo el azufre como aceptor de electrones (*véase* Tabla 12.21). Bacterias como *Desulfuromonas* se aíslan a partir de los mismos hábitat que las bacterias reductoras de sulfato y, ocasionalmente, forman asociaciones con bacterias que oxidan el H_2S hasta S^0, como son las bacterias verdes del azufre (*véase* Sección 12.33). El azufre producido se reduce hasta H_2S durante el metabolismo de las reductoras de azufre, completando así un ciclo anaeróbico del azufre (*véase* Secció 19.13).

Fisiología de las bacterias reductoras de sulfato

El rango de donadores de electrones utilizados por las bacterias reductoras de sulfato es bastante amplio. El H_2, lactato y el piruvato son utilizados casi universalmente y muchas de las especies del Grupo I utilizan malato, sulfonatos y ciertos alcoholes primarios (por ejemplo metanol, etanol, propanol y butanol). Algunas estirpes de *Desulfotomaculum* utilizan glucosa, pero esto es bastante raro entre los reductores de sulfato. El grupo I de las bacterias reductoras de sulfato oxidan su fuente de energía hasta acetato y, entonces, lo excretan como producto final. El Grupo II difiere del I en que son capaces de oxidar lactato, succinato e incluso el benzoato hasta CO_2. *Desulfosarcina, Desulfonema, Desulfococcus, Desulfobacterium, Desulfotomaculum* y ciertas especies de *Desulfovibrio* son únicas entre las reductoras de sulfato, en el sentido de que pueden crecer quimiolitotróficamente y autotróficamente utilizando el H_2 como donador de electrones, el sulfato como aceptor de electrones y el CO_2 como fuente de carbono.

Además de utilizar el sulfato como aceptor de electrones, muchas de las bacterias reductoras de sulfato pueden crecer utilizando *nitrato* (NO_3^-) como aceptor de electrones, reduciendo el NO_3^- a amoníaco, o sulfonatos tales como el isotionato ($HO—CH_2—CH_2—SO_3^-$) a azufre elemental (S^0) que son reducidos hasta ácido sulfídrico (H_2S), o incluso, pueden utilizar ciertos compuestos orgánicos para la generación de energía, vía fermentación, en ausencia de aceptores de electrones terminales. El compuesto fermentable más usual es el *piruvato* que es convertido hasta acetato y CO_2, vía reacción fosforoclástica (*véase* Figura 17.51). Además y aunque se pensó durante mucho tiempo que eran anaerobios *estrictos*, algunos aislados coexisten con cianobacterias y su resistencia al oxígeno es notable y, de hecho, son capaces de respirar, actuando el oxígeno como aceptor de electrones. Sin embargo, la respiración aeróbica no propicia el crecimiento y probablemente es un medio de quitar el oxígeno en ambientes que, excepto por el oxígeno, sería bueno para ellas.

Aislamiento

El enriquecimiento de *Desulfovibrio* es relativamente fácil en medio anóxico lactato/sulfato que contenga ion ferroso. Se añade también un agente reductor como tioglicolato o ascorbato para bajar el E_0'. Cuando se origina ácido sulfídrico a partir del sulfato, éste se combina con el ion ferroso para dar lugar al precipitado negro de sulfuro de hierro. Este ennegrecimiento indica no solamente la reducción de sulfato y formación de sulfídrico sino que, al originarse el sulfuro de hierro, se destoxifica el ácido sulfídrico lo que permite el crecimiento celular con mayor rendimiento. Después del crecimiento inicial se aíslan las bacterias bien por cultivo anaerobio en tubos giratorios o en placas de Petri en cámaras especiales para anaerobios (Sección 18.1 y Figura 18.3*b*). Por otra parte, también se pueden utilizar tubos de agar fundido para el aislamiento. En el *método del tubo de agar fundido*, una pequeña cantidad de líquido del enriquecimiento original se añade a un tubo con medio de cultivo y agar fundido, se mezcla y secuencialmente se diluye en una serie de tuvos de agar fundido (*véanse* Sección 18.1 y Figura 18.3*b*). Después de la solidificación las células individuales se distribuyen a lo largo del agar formando colonias negras que pueden aislarse asépticamente y todo el proceso se repite hasta que se obtienen cultivos axénicos (puros).

✓ 12.18 Revisión de conceptos

Las bacterias reductoras de sulfato y de azufre son un gran grupo de Proteobacterias de la división delta que se hayan unificadas por los procesos fisiológicos que implica la reducción de SO_4^{2-} o S^0 elemental hasta ácido sulfídrico en condiciones anaeróbicas. Se conocen dos subgrupos fisiológicos: el Grupo I que es incapaz de oxidar el acetato hasta anhídrido carbónico y el Grupo II que sí lo hace.

✓ ¿Qué sustrato orgánico se utilizaría para enriquecer y aislar el grupo I de bacterias sulfato-reductoras?

✓ En el caso de las bacterias reductoras de sulfato que además son quimiolitotrofas y autótrofas: (1) ¿Cuál es el donador de electrones?, (2) ¿Cuál es el aceptor de electrones? y (3) ¿Cuál es la fuente de carbono?

✓ ¿En qué difiere, fisiológicamente hablando, *Desulfuromonas* de *Desulfovibrio*?

III PHYLUM 2: *BACTERIA* GRAM POSITIVAS

12.19 *Bacteria* Gram positivas no esporuladas, con bajo contenido en GC: *Bacteria* del ácido láctico y géneros relacionados

Géneros clave

Staphylococcus
Micrococcus
Streptococcus
Lactobacillus

Como se ha mencionado en la introducción de este capítulo, las *Bacteria* Gram positivas se dividen en dos grandes subdivisiones filogenéticas: las de bajo contenido en GC y las de alto. En esta sección se consideran los géneros *Staphylococcus*, *Sarcina* y *Micrococcus*, por su parecido mor-

TABLA 12.22 Características distintivas de los cocos Gram positivos

Género	Movilidad	Agrupación celular	Crecimiento por fermentación	DNA (GC mol %)	Grupo filogenético[a]	Otras características
Micrococcus	–	Tétradas, racimos	–	66-73	Alto GC	Aerobio estricto
Staphylococcus	–	Parejas, racimos	+	30-39	Bajo GC	Único género en este grupo con ácidos teicoicos
Stomatococcus	–	Racimos, parejas	+	56-60	Actinobacterias	Único género con cápsula
Planococcus	+	Parejas, tétradas	–	39-52	Bajo GC	Marino
Sarcina	–	Paquetes cúbicos de 8 o más células	+	28-31	Bajo GC	Muy ácido tolerante. Celulosa en pared celular
Ruminococcus	+	Parejas, cadenas	+	39-46	Bajo GC	Anaerobio estricto rumen e intestino grueso de animales
Peptococcus	–	Racimos, parejas	+	50-51	Bajo GC	Anaerobio estricto; fermenta peptona pero no azúcares
Peptostreptococcus	–	Racimos, cadenas cortas	+	28-37	Bajo GC	Anaerobio estricto; fermentan peptona. Piel. Intestino. Vagina. Vaginosis

[a] Todas son miembros de *Bacteria* Gram positivas (Figura 12.1), exceptuando a *Stomatococcus*.

fológico aunque en sentido estricto el último pertenece a los de «alto contenido en GC», junto con las bacterias bacilares lácticas y no esporuladas más típicas. En la Tabla 12.22, se recogen las características básicas de estos géneros.

Staphylococcus y *Micrococcus*

Staphylococcus (Figura 12.51) y *Micrococcus* son ambos aerobios, con metabolismo respiratorio típico. Son catalasa positivo, lo que permite diferenciarlos de las especies del género *Streptococcus* y otros géneros de cocos Gram positivos, que son relativamente tolerantes de medios con baja actividad de agua, resistiendo bastante bien hábitatss secos y salinos. De hecho, esta última característica de soportar altas concentraciones de sal, proporciona una buena herramienta para el aislamiento primario en medios que contengan 7-8% de NaCl. A menudo son pigmentados, lo que da una herramienta adicional para su identificación. Los dos géneros aquí contemplados se separan muy bien por medio de la prueba O/F (Tabla 24.3). *Micrococcus* es un aerobio estricto y produce ácido de la glucosa solo en condiciones aerobias, mientras que *Staphylococcus* es anaerobio facultativo y produce ácido de la glucosa tanto en aerobiosis como en anaerobiosis.

Los estafilococos son parásitos comunes de los humanos y animales y ocasionalmente causan infecciones serias: se reconocen dos especies importantes en relación con los humanos, *Staphylococcus epidermidis*, no patógeno y apigmentado que normalmente se encuentran en la piel y las mucosas y *Staphylococcus aureus*, de color amarillo y normalmente asociado con patologías como forúnculos, neumonía, osteomielitis, meningitis y artritis. Se discute la patogénesis de esta especie en el Capítulo 21 y las infecciones estafilocócicas en los Capítulos 26 y 27. Las especies de *Micrococcus* se aíslan también de la piel, pero son mucho más comunes en objetos inanimados como son partículas de polvo y suelo.

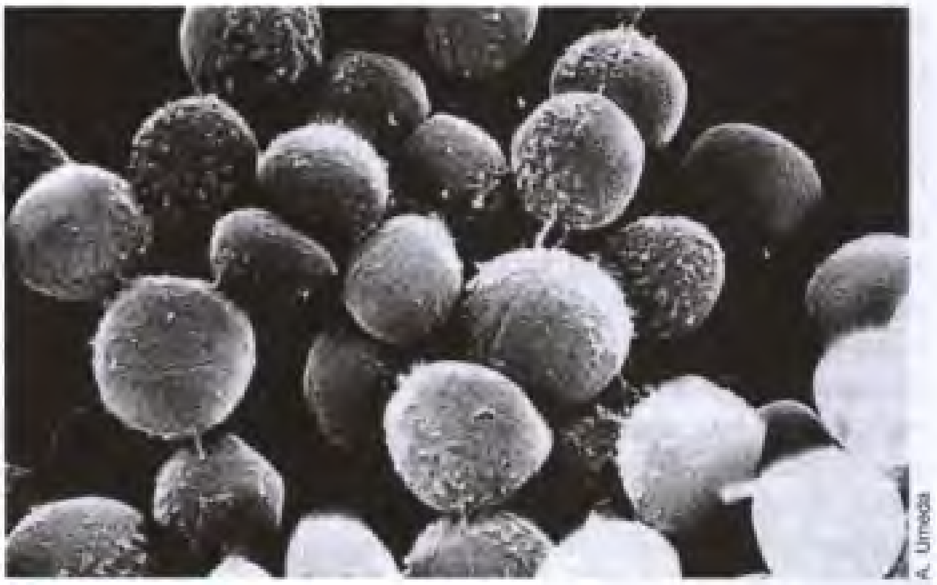


Figura 12.51 Micrografía electrónica de barrido de un típico *Staphylococcus* mostrando la organización irregular. Diámetro celular de 0,8 µm.

Sarcina

El género *Sarcina* contiene especies cuyas células se dividen en tres planos perpendiculares para dar paquetes celulares de 8 células o más (Figura 12.52*a*). Son anaerobios estrictos y resisten condiciones extremas de acidez, siendo capaces de fermentar azúcares y crecer a pH inferior a 2. Las células de una especie, *S. ventriculi*, contienen una capa de celulosa gruesa y fibrosa alrededor de la pared celular (Figura 12.52*b*). Las capas celulósicas de células adyacentes se adhieren entre sí y funcionan como matriz cementante para mantener juntos los paquetes celulares. Las especies de este género se aíslan del suelo, barro, heces y contenidos estomacales. Debido a la resistencia al pH, *S. ventriculi*, es una de las pocas especies bacterianas que pueden crecer en el estómago de los humanos y muchos otros animales monogástricos. De hecho, en pacientes que sufren de ulceración pilórica suele observarse un rápido crecimiento de esta especie bacteriana.

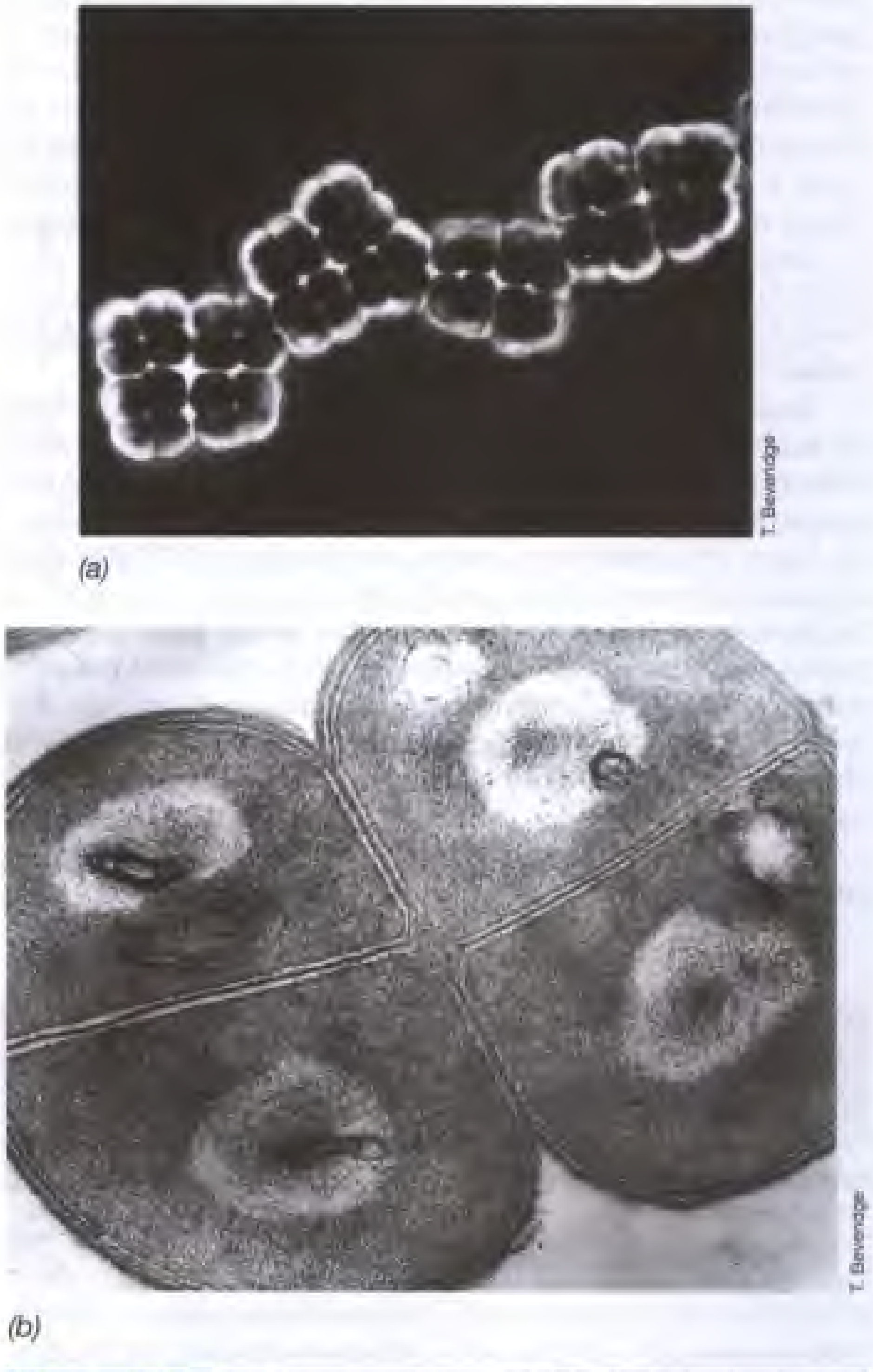


Figura 12.52 (a) Micrografía de contraste de fases de un coco Gram positivo, *Sarcina* sp. Diámetro celular de 2 µm. (b) Micrografía electrónica (corte fino). La capa más externa de la célula es de celulosa.

Fermentación y bacterias del ácido láctico

Las bacterias del ácido láctico son bacilos o cocos Gram positivos que originan ácido láctico como producto de fermentación. Los miembros de este grupo carecen de porfirinas y citocromos, no llevan a cabo transporte de electrones vía fosforilación, con lo que obtienen la energía solamente a través de la *fosforilación a través del sustrato*. Todas estas bacterias crecen anaeróbicamente. No obstante, al contrario que las anaerobias, no son sensibles al oxígeno y pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de él; por ello, se les considera como **anaerobios aerotolerantes**. La mayoría de las bacterias lácticas obtienen su energía solamente del metabolismo de los azúcares y, por esta razón, sus hábitat están restringidas a la presencia de azúcares. Tienen metabolismo biosintético bastante limitado, con lo que requieren medios de cultivo ricos con aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (*véase* Tabla 5.4).

Una diferencia importante entre los subgrupos de las bacterias lácticas radica en qué tipos de productos de fermentación generan a partir de los azúcares. El grupo llamado **homofermentativo** produce solamente el *ácido láctico*, mientras que el **heterofermentativo** produce otros compuestos como etanol y CO_2 (Tabla 12.23). En la Figura 12.53 pueden observarse las rutas abreviadas de la fermentación de la glucosa por organismos homo o heterofermentadores. La diferencia viene marcada por la presencia o ausencia de la enzima **aldolasa**, enzima clave de la glucolisis (*véase* Figura 5.14). Los heterofermentadores, carecen de esta aldolasa y no pueden romper la fructosa difosfato. En su lugar, oxidan la glucosa-6-fosfato hasta 6-fosfogluconato y después lo descarboxilan hasta pentosa fosfato que se escinde hasta triosa fosfato y acetil fosfato por medio de la **fosfocetolasa** (Figura 12.53).

En los heterofermentadores, la triosa fosfato se convierte en ácido láctico con la producción de una molécula de ATP, mientras que el acetil fosfato acepta electrones del NADH que se ha generado durante la génesis de la pentosa fosfato, da lugar directamente a etanol sin producir ATP. Por ello, los heterofermentadores, producen solamente *1 mol* ATP de la glucosa en lugar de dos como hacen los homofermentadores. Como los heterofermentadores descarboxilan el 6-fosfogluconato, producen CO_2 como producto de fermentación final; basta simplemente observar la producción de burbujas de anhídrido carbónico para reconocer uno de estos microorganismos.

Los diversos géneros de bacterias del ácido láctico se han definido sobre la base de su morfología celular, DNA y tipo de fermentación como se muestra en la Tabla 12.23. Los miembros de los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, tienen una composición de bases de DNA muy parecida, existiendo muy poca variación de estirpe a estirpe. El género *Lactobacillus*, por otra parte, posee miembros con composición de bases de DNA muy diversa y por ello no constituyen un grupo homogéneo.

Streptococcus y otros cocos

El género *Streptococcus* (Figura 12.54) contiene una amplia variedad de especies homofermentativas con hábitat muy diversos y con actividades de mucha importancia para el ser humano. Algunas especies son patógenas primarias de mamíferos (Sección 26.2). Como productores de ácido láctico juegan un papel muy importante en la producción de leches fermentadas, ensilado y una pléyade de productos de fermentación (Sección 29.2); además, ciertas especies están implicadas en el desarrollo de la caries dental (Sección 21.3). Para distinguir especies patogénicas y no patogénicas del ser humano, se ha reestructurado el género en tres, a saber: *Streptococcus*, *Lactococcus* (estreptococos de importancia en industria lechera) y *Enterococcus* (estreptococos de origen fecal).

Las especies que se agrupan en el género *Streptococcus* se dividen en dos grupos sobre la base de las características que se enumeran en la Tabla 12.24. La hemólisis en placas de agar sangre es de considerable importancia. Las colonias que producen estreptolisinas S y O están rodeados de una gran zona de hemólisis completa (trasparente) que se llama **β hemólisis** (Figura 21.17*a*). Por otra parte, muchos estreptococos, lactococos y enterococos no producen hemólisis sino la formación de una zona verde alrededor de las colonias que no es verdadera hemólisis, sino la pérdida masiva de potasio por parte de los eritrocitos del agar sangre. Este fenónemo se conoce como **α hemólisis**. Los estreptococos y cocos relacionados se subdividen en grupos inmunológicos basándose en la presencia de antígenos específicos. Estos grupos antigénicos (o grupos de Lancefield como se les conoce normalmente, en honor a Rebecca Lancefield, pionera en la taxonomía de los estreptococos), se designan con letras; desde la A a la O. Los estreptocos *β* hemolíticos humanos normalmente son del grupo A, mientras que los enterococos lo son del D. Los del grupo B suelen asociarse con animales y causar mastitis en vacas y pueden

TABLA 12.23 Diferenciación de los principales géneros de las bacterias lácticas[a]

Género	Morfología celular y agrupación	Fermentación	DNA (GC mol %)
Streptococcus	Cocos en cadenas	Homofermentativo	34-46
Leuconostoc	Cocos en cadenas	Homofermentativo	38-41
Pediococcus	Cocos en tétradas	Homofermentativo	34-42
Lactobacillus	(1) Bacilos, en cadenas	Homofermentativo	32-53
	(2) Bacilos en cadenas	Heterofermentativo	34-53
Enterococcus	Cocos en cadenas	Homofermentativo	38-40
Lactococcus	Cocos en cadenas	Homofermentativo	38-41

[a] Filogenéticamente, todos estos microorganismos son miembros de la subdivisión de *Bacteria* Gram positivas con bajo contenido en GC.

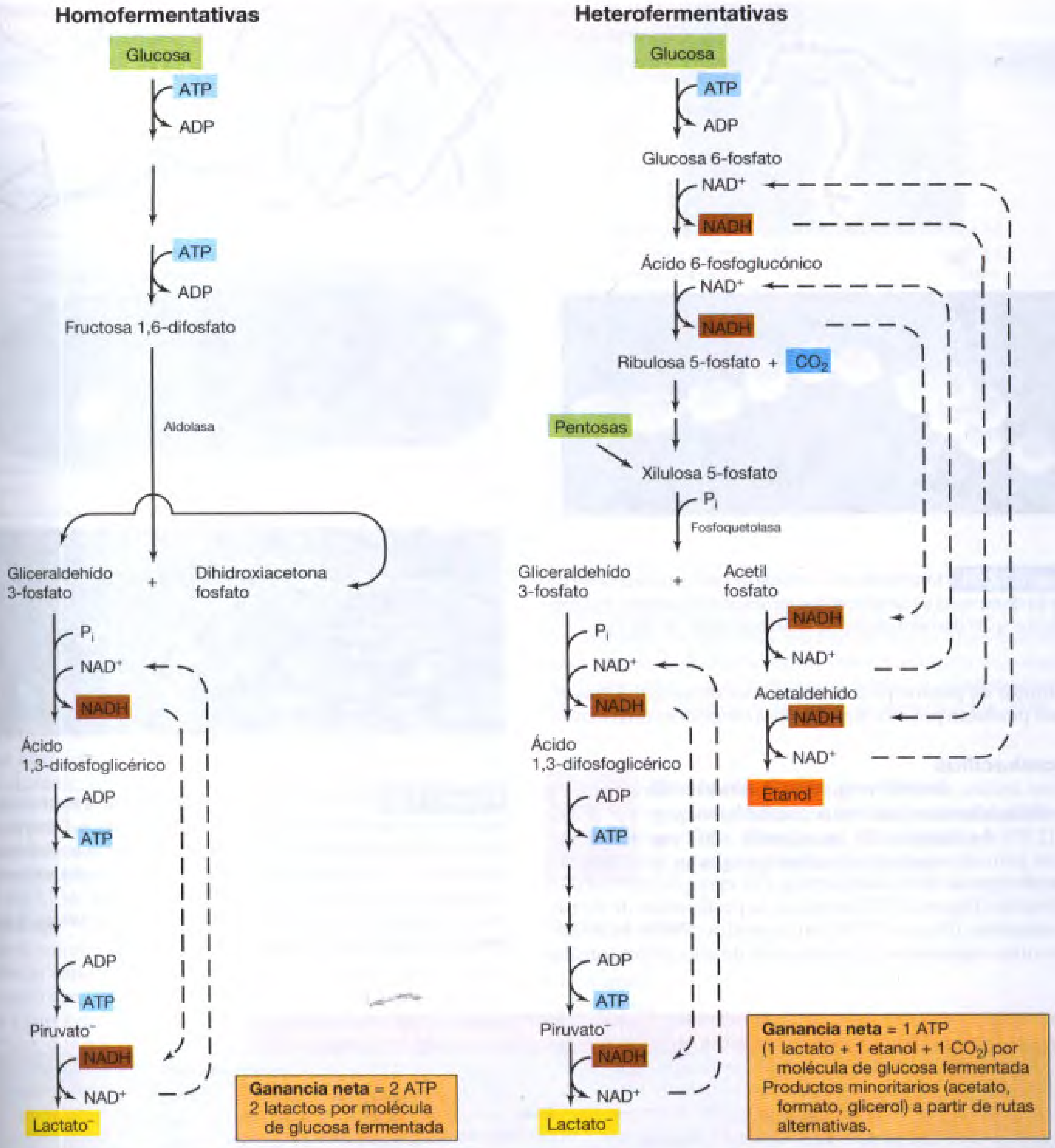

Homofermentativas
Glucosa
ATP
ADP
ATP
ADP
Fructosa 1,6-difosfato
Aldolasa
Gliceraldehído 3-fosfato
+
Dihidroxiacetona fosfato
P_i
NAD^+
NADH
Ácido 1,3-difosfoglicérico
ADP
ATP
ADP
ATP
$Piruvato^-$
NADH
NAD^+
$Lactato^-$
Ganancia neta = 2 ATP
2 latactos por molécula de glucosa fermentada
Heterofermentativas
Glucosa
ATP
ADP
Glucosa 6-fosfato
NAD^+
NADH
Ácido 6-fosfoglucónico
NAD^+
NADH
Ribulosa 5-fosfato + CO_2
Pentosas
Xilulosa 5-fosfato
P_i
Fosfoquetolasa
Gliceraldehído 3-fosfato
+
Acetil fosfato
NADH
NAD^+
Acetaldehído
NADH
NAD^+
Etanol
P_i
NAD^+
NADH
Ácido 1,3-difosfoglicérico
ADP
ATP
ADP
ATP
$Piruvato^-$
NADH
NAD^+
$Lactato^-$
Ganancia neta = 1 ATP
(1 lactato + 1 etanol + 1 CO_2) por molécula de glucosa fermentada
Productos minoritarios (acetato, formato, glicerol) a partir de rutas alternativas.

Figura 12.53 Fermentación de la glucosa en bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas. Nótese que no se origina ATP en las reacciones que conducen a etanol. Si el oxígeno está presente, muchas bacterias lácticas homofermentativas pueden reducir el oxígeno con NADH (a través de flavinas como intermediarios), con formación de agua; se forma acetato en lugar de etanol y esto permite la producción de un ATP adicional.

causar infecciones en humanos. Los lactococos, industriales por excelencia, son del grupo N y no son patógenos.

Incluidos en el género *Leuconostoc* están los cocos heterofermentadores. Las estirpes de este género producen radicales saborizantes como diacetilo o acetoína, productos de la ruptura metabólica del citrato y han sido muy utilizados en la industria lechera como cultivos iniciadores. Algunas especies del género producen grandes cantidades de polisacáridos de dextrano (α-1,6-glucano) cuando se cultivan en sacarosa (Figura 17.64) y algunas de ellas han encontrado su uso como

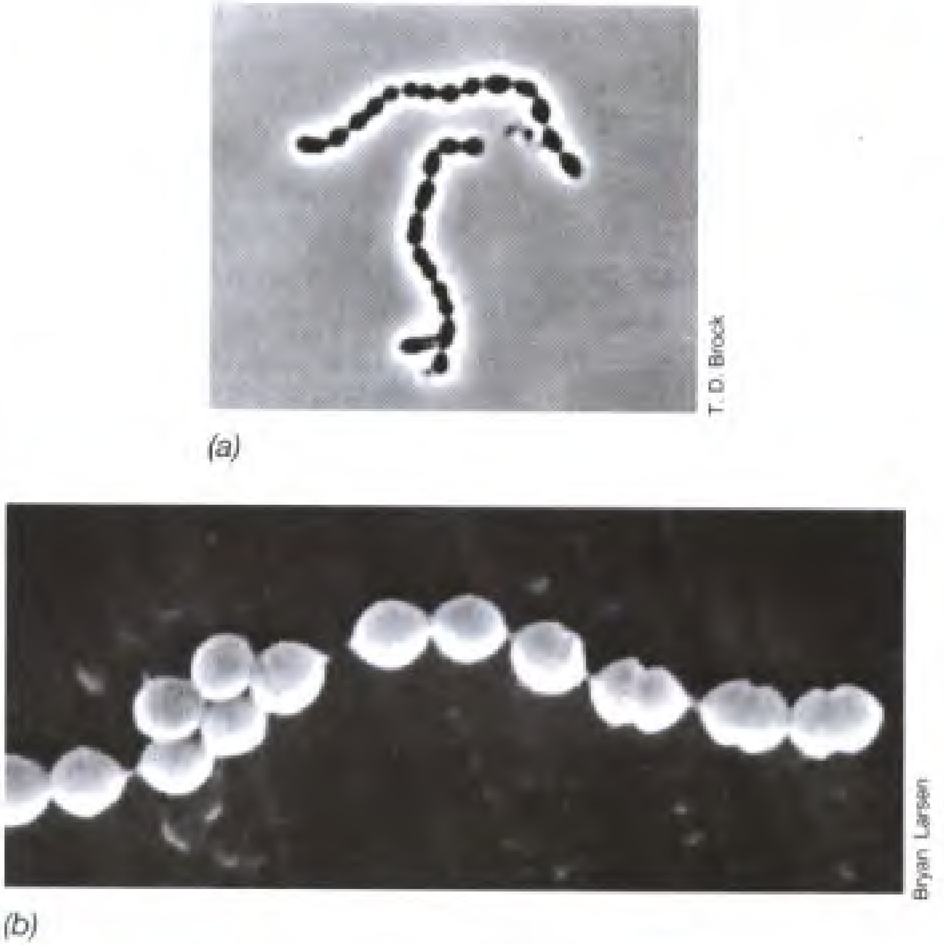


Figura 12.54 Micrografías de contraste de fases (a) y electrónica barrido (b) de especies de *Streptococcus*. (a) *Streptococcus lactis*. (b) *Streptococcus* sp. El diámetro celular es, en ambos casos, de 0,5-1 µm.

sustitutos de plasma para transfusiones de sangre. Otras estirpes producen polímeros de fructosa conocidos como *levanos*.

Lactobacillus

Como indica el nombre genérico, estas bacterias son de morfología bacilar variando en su longitud y grosor (Figura 12.55). La mayoría de las especies son homofermentadoras pero algunas son heterofermentadoras. Son comunes en todo tipo de derivados lácteos. Por ejemplo *Lactobacillus delbrueckii* (Figura 12.55) se usa en la producción de yogur, *L. acidophilus* (Figura 12.55*a*) en la producción de leche ácida y otras especies en la producción de encurtidos, ensila-

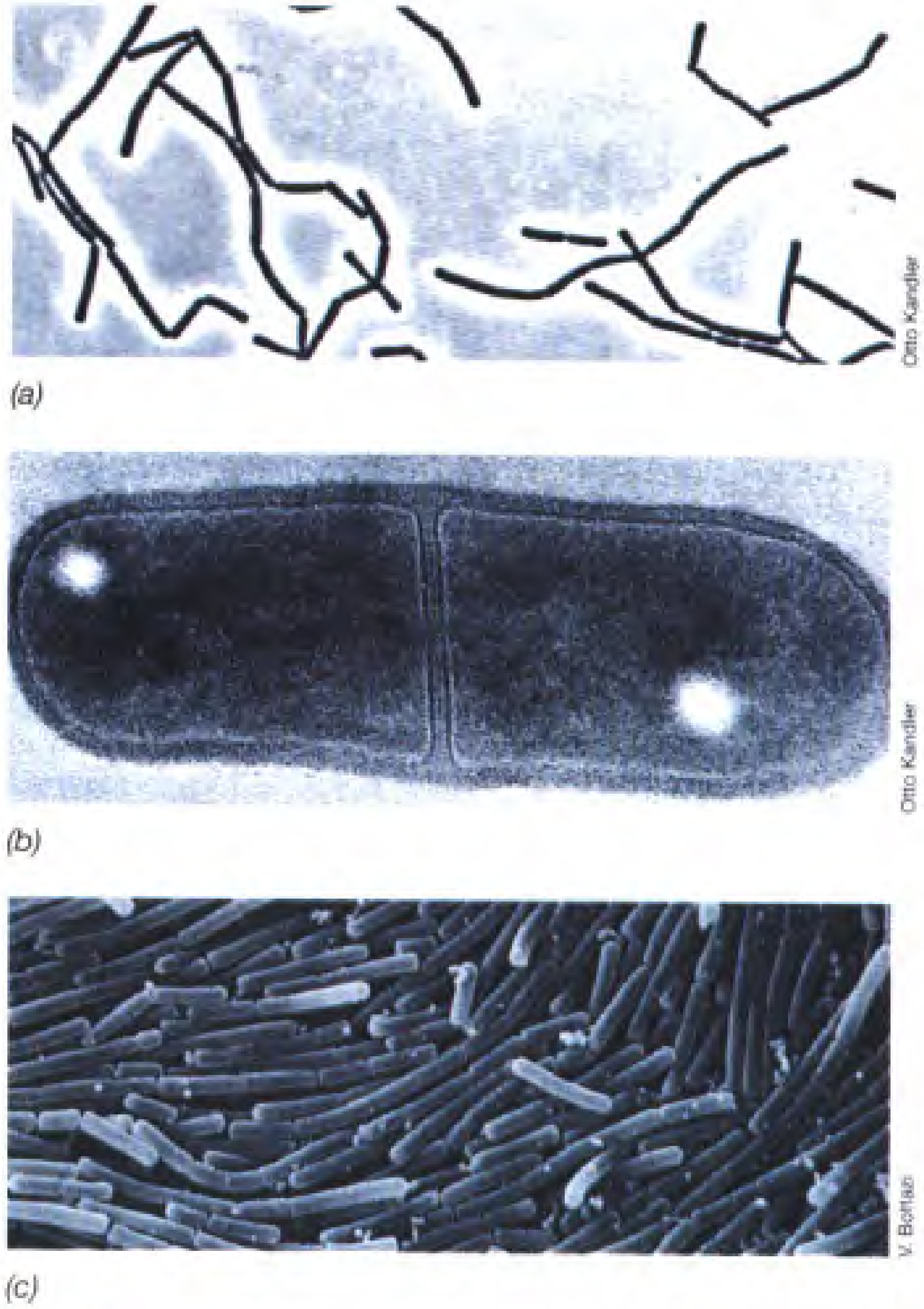


Figura 12.55 Micrografías de contraste de fases y electrónica de especies de *Lactobacillus*. (a) *Lactobacillus acidophilus*. Diámetro celular de 0,75 µm. (b) *Lactobacillus brevis*, micrografía electrónica de transmisión. Tamaño celular 0,8 × 2 µm. (c) *Lactobacillus delbrueckii* microscopía electrónica de barrido. Diámetro celular de 0,7 µm. Se conocen especies heterofermentativas y homofermentativas de *Lactobacillus* (*véase* Figura 12.53).

TABLA 12.24 Características diferenciales de estreptococos, lactococos y enterococos

Grupo	Grupo de Lancefield	Especie representativa	Tipo de hemólisis	Buen crecimiento		Sobrevive a 60°C durante 30 min	Crecimiento en:		Hábitat
				10°C	45°C		Leche con 0,1% de azul de metileno	Medio con 40% de bilis	
Streptococcus									
Pyogenes Subgrupo de	A,B,C,F,G	*Streptococcus* S. *pyogenes*	Lisis (β)	–	–	–	–	–	Tracto respiratorio
Viridans Subgrupo	—	*Streptococcus* S. *mutans*	Reverdecimiento (α)	–	+	–	–	–	Boca, intestino
Enterococos	D	*Enterococcus faecalis*	Lisis (β), reverdecimiento (α), o nada	+	+	+	+	+	Intestino, vagina, plantas
Lactococos	N	*Lactococcus lactis*	Nada	+	–	+	+	+	Plantas, leche

TABLA 12.25 Géneros más representativos de bacterias esporoformadoras[a]

Características	Género	DNA (GC mol %)
Bacilos		
Aerobios o facultativos, catalasa positiva	*Bacillus*	32-69
	Paenibacillus	40-54
Microaerofílicos, catalasa negativa, productores de ácido láctico por homofermentación	*Sporolactobacillus*	46-47
Anaeróbicos:		
reductores de sulfato	*Desulfotomaculum*	38-50
no reductores de sulfato, fermentadores	*Clostridium* (Figura 12.56)	21-54
termofílicos 65–70°C, fermentadores	*Thermoanaerobacter*	31-39
Gram negative; can grow as homoacetogen on H_2 + CO_2	*Sporomusa*	41-49
Halófilo, aislado en el Mar Muerto	*Sporohalobacter*	31
Produce hasta 5 esporas por célula; fija nitrógeno N_2	*Anaerobacter*	29
Acidófilo (pH 3)	*Alicyclobacillus*	52-60
Alcalófilo (PH 9)	*Amphibacillus*	36-38
Fototrópico	*Heliobacterium, Heliophilum*	50-58
Sintróficos, degradan ácidos grasos pero solamente en co-cultivo una bacteria que utilice el hidrógeno (Sección 17.21)	*Syntrophospora*	37
Metaboliza clorofenoles (Sección 17.18)	*Desulfitobacterium*	46
Cocos		
Normalmente en tétradas, aeróbicos	*Sporosarcina* (Figura 12.60)	40-41

[a] Filogenéticamente son miembros de la subdivisión de bajo GC de las *Bacteria* Gram positivas.

do y pepinillos ácidos (Sección 29.2). Los lactobacilos son generalmente más resistentes a las condiciones ácidas que otras bacterias lácticas, siendo capaces de crecer hasta pHs de 4. Por ello, son fácilmente aislables de una gran cantidad de hábitat por selección directa en medios, conteniendo azúcares y ácidos, como es el caso de zumo de tomate/peptona agar. Esta resistencia al pH les permite seguir creciendo durante las fermentaciones lácticas naturales, aun cuando el pH haya caído tanto, que otras bacterias lácticas ya no pueden crecer. Por ello, las lactobacterias son las responsables siempre de terminar la inmensa mayoría de las fermentaciones lácticas. No son patógenos.

Listeria

Listeria son cocobacilos Gram positivos que tienden a formar cadenas cortas de 3-5 células. Está filogenéticamente relacionado con *Lactobacillus* y como él produce ácido, pero no gas a partir de la glucosa. Pero al contrario que las bacterias lácticas, que como se ha dicho pueden crecer en condiciones anóxicas estrictas y además carecen de catalasa, las listerias requieren condiciones microaerofílicas y son catalasa positiva. Aunque se conocen varias especies de *Listeria*, *L. monocytogenes* es la más importante y la causante de infecciones alimentarias conocidas como *listeriosis* (Sección 29.9). El microorganismo se transmite normalmente por alimentos listos para consumir (el queso es un vehículo común de transmisión) y puede causar meningitis fatales. La listeriosis será descrita más adelante en la presente obra (Sección 29.9)

12.20 *Bacteria* Gram positivas esporuladas, con bajo contenido en GC: *Bacillus*, *Clostridium* y géneros relacionados

Géneros clave

Bacillus
Clostridium
Sporosarcina
Heliobacterium

Clásicamente se han reconocido varios géneros de bacterias Gram positivas formadoras de endosporas (Tabla 12.25), que se distinguen sobre la base de la morfología celular, forma y disposición de la espora (Figura 12.56), rela-

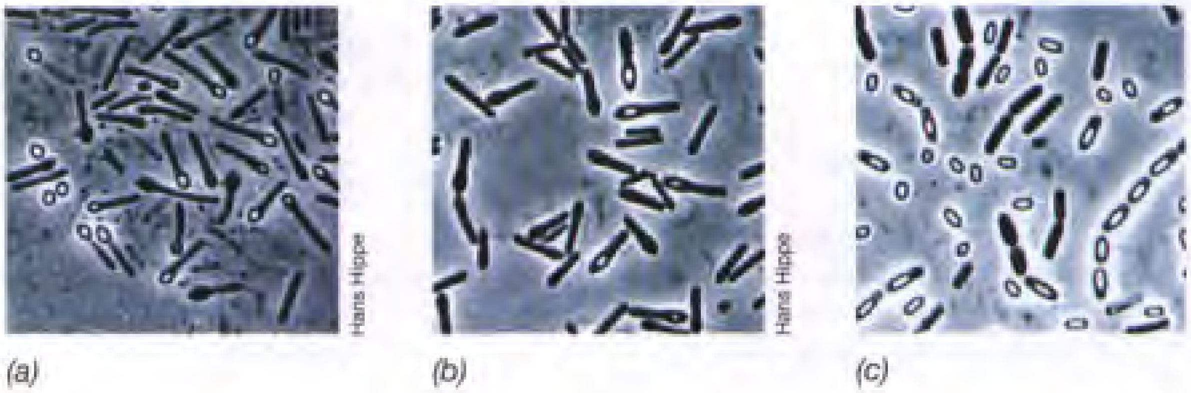


Figura 12.56 Micrografías de contraste de fases de varias especies de *Clostridium* mostrando diversas ubicaciones de la endospora. (a) *Clostridium cadaveris*, esporas terminales. Diámetro celular de 0,9 µm. (b) *Clostridium sporogenes*, esporas subterminales. Diámetro celular de 1 µm. (c) *Clostridium bifermentans*, esporas centrales. Diámetro celular de 1,2 µm.

ción con el oxígeno y metabolismo energético. Todos los esporoformadores están en la subdivisión de «bajo contenido en GC». Los dos géneros más estudiados son: *Bacillus*, que agrupa especies aerobias o facultativas y *Clostridium* que agrupa las especies anaerobias y fermentadoras. Un grupo de endosporoformadores (las heliobacterias) son fototróficas (del griego helios, sol). La estructura y la resistencia al calor de la espora así como el proceso de endosporulación se discutió en la Sección 4.15.

Aunque existe considerable heterogeneidad entre los endosporoformadores (por ejemplo, en el género *Bacillus* el índice GC puede variar hasta un 40%), existe un principio ecológico unificante, ya que el hábitat primario de todos ellos es el suelo. Incluso aquellas especies que son muy patógenos para el hombre, son saprofitos del suelo. De hecho la capacidad de producir una forma de resistencia como es la endospora, da una gran ventaja ecológica en un medio como es el suelo donde pueden variar las cifras de humedad y de temperatura entre rangos muy variables. Allí, las formas esporuladas durmientes pueden permanecer durante mucho tiempo, incluso millones de años, hasta que las condiciones sean favorables y puedan germinar de nuevo (*véase* Sección 4.15)

Los formadores de esporas pueden aislarse fácilmente del suelo, alimentos, polvo y otros materiales tratando las muestras a 80°C durante 10 minutos (pasteurización). A esta temperatura sólo sobreviven las esporas bacterianas. Inoculando ahora un medio apropiado e incubando aeróbica o anaeróbicamente, da lugar a colonias de los géneros *Bacillus* o *Clostridium*.

Bacillus

Las especies del género *Bacillus* crecen bien en medios definidos utilizando una pléyade de fuentes de carbono. Muchos producen enzimas extracelulares, como hidrolasas, que rompen polisacáridos complejos, ácidos nucleicos o ácidos grasos hasta unidades asimilables por las células; estos productos sirven como fuentes de carbono y donadores de electrones. Muchos producen antibióticos como son la bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y circulina. En la mayoría de los casos, la producción de antibióticos está relacionada con el proceso de esporulación; de modo que el antibiótico se produce cuando el cultivo entra en fase estacionaria y después de que se haya iniciado el proceso de endosporulación (los antibióticos son metabolitos secundarios, productos de la idiofase, por ello se llaman *idiolitos*). En la Tabla 12.26 se recogen las características más representativas de las especies del género *Bacillus*.

Algunas de sus especies, como por ejemplo *B. popilliae* y *B. thuringiensis* que producen toxinas larvicidas de insectos. *B. popilliae* causa una enfermedad fatal (enfermedad lechosa) en larvas de los *Scarabeidae* y escarabajos relacionados. *B. thuringiensis* produce enfermedades mortales para larvas de muchos grupos de insectos: lepidópteros, gusanos de seda, dípteros (moscas y mosquitos), coleópteros(escarabajo de la patata) etc. Comercialmente ya existen preparaciones esporales con cristales parasporales (en los que reside la toxina correspondiente) de *B. thuringiensis* y *B. popilliae*, que se emplean rutinariamente en la lucha biológica.

La enfermedad causada por *B. popilliae* es una septicemia, mientras que la causada por *B. thuringiensis* es esencialmente una intoxicación. Ambos forman *cuerpos parasporales cristalinos* durante la esporulación, que se depositan fuera de la espora propiamente dicha (Figura 12.57). En el caso de *B. thuringiensis* la proteína del cuerpo parasporal es una protoxina que se convierte en toxina por ruptura proteolítica en el intestino de las larvas.

TABLA 12.26 Características de especies representativas del género *Bacillus*

Característica	Especie	Posición de espora	DNA (GC mol %)
I. Espora oval o cilíndrica, aerobios facultativos; hidrolizan caseína y almidón; el esporangio no está distendido; pared de la espora delgada			
Termófilos y acidófilos	*B. coagulans*	Central o terminal	47
	B. acidocaldarius	Terminal	60
Mesófilos	*B. licheniformis*	Central	46
	B. cereus	Central	35
	B. anthracis	Central	33
	B. megaterium	Central	37
	B. subtilis	Central	43
Patógeno de insectos	*B. thuringiensis*	Central	34
Esporangios distendidos, pared de la espora gruesa			
Termófilo	*B. stearothermophilus*	Terminal	52
Mesófilo	*B. polymyxa*	Terminal	44
	B. macerans	Terminal	52
	B. circulans	Central o terminal	35
Patógenos de insectos	*B. larvae*	Central o terminal	—
	B. popilliae	Central	41
II. Esporas esféricas, aerobios estrictos; no hidrolizan la caseína o el almidón			
Esporangios distendidos	*B. sphaericus*	Terminal	37
Esporangios no distendidos	*B. pasteurii*	Terminal	38

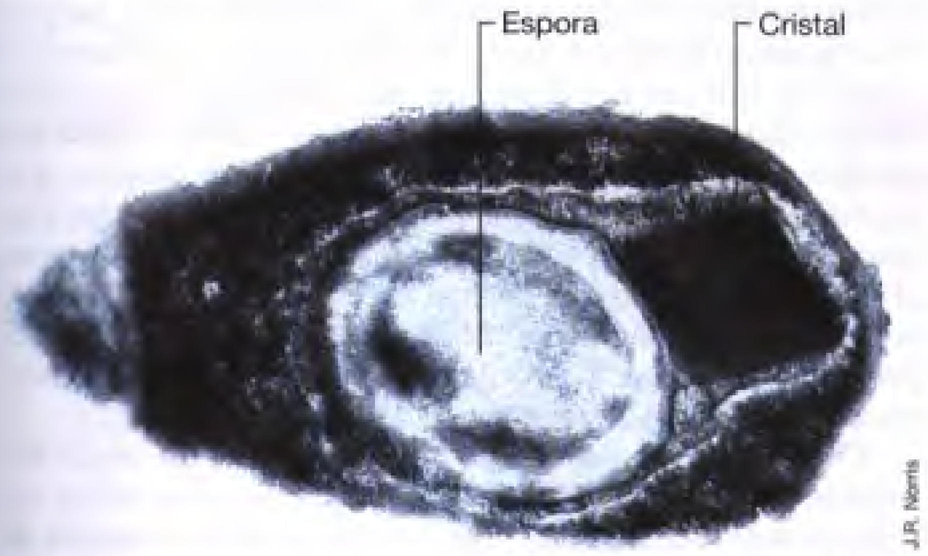


Figura 12.57 Formación del cristal parasporal tóxico en el patógeno de insectos *Bacillus thuringiensis*. Micrografía electrónica (corte fino) de una célula esporulada. La proteina del cristal (toxina Bt) es tóxica para algunos insectos produciendo la lisis de las células intestinales.

La toxina se une a las células epiteliales del intestino e induce la formación de poros y lisis celular.

Los genes que codifican las proteínas del cristal, conocidos comercialmente como «toxina Bt», se han aislado de diversas cepas de *B. thuringiensis* y se han clonado en plantas para dar plantas transgénicas que son resistentes a los insectos. Esta estrategia se ha demostrado efectiva en gran cantidad de situaciones y hoy existen varios genes alterados de estas toxinas con toxicidad mas fuerte frente a los insectos (Sección 31.7).

Clostridium

Los clostridios carecen de sistemas citocrómicos y de los mecanismos de fosforilación por transporte de electrones; por tanto y al contrario que *Bacillus* obtienen la energía solamente por fosforilación de sustrato y son, pues, fermentadores. Se conoce una gran diversidad de mecanismos productores de energía en los clostridios (la diversidad fermentativa será discutida en la Sección 17.20); de hecho, la separación del género en subgrupos se basa primariamente en las propiedades y naturaleza del sustrato fermentable (Tabla 12.27).

Diversos clostridios fermentan los azúcares para producir *ácido butírico* como producto final; otras producen

TABLA 12.27 Características de algunos grupos del género *Clostridium*

Característica clave	Otras características	Especies	DNA (GC mol %)
I. Fermentación de carbohidratos			
Fermentación de celulosa	Productos de fermentación: acetato, lactato, succinato, etanol, CO_2, H_2	*C. cellobioparum* *C. thermocellum*	28 38-39
Fermentación de azúcares, almidón y pectina	Productos de fermentación: acetona, butanol, butanol, etanol, isopropanol, butirato acetato, propionato, succinato CO_2, H_2; algunos fijan N_2	*C. butyricum* *C. acetobutylicum* *C. pasteurianum* *C. perfringens* *C. thermosulfurogenes*	27-28 28-29 26-28 24-27 33
Fermentación de azúcares hasta ácido acético	Síntesis total de acetato desde el CO_2; citocromos presentes en algunas especies	*C. aceticum* *C. thermoaceticum* *C. formicoaceticum*	33 54 34
Fermentación de pentosas o metilpentosas	Células en forma de anillo, cadenas helicoidales productos de fermentación: acetato, propionato *n*-propanol, CO_2, H_2	*C. methylpentosum*	46
II. Fermentación de aminoácidos	Productos de fermentación: acetato, otros ácidos grasos, NH_3, CO_2, algunas veces H_2; algunos fermentan azúcares hasta butirato y acetato; pueden producir exotoxinas (Secciones 21.10, 27.8 y 29.5	*C. sporogenes* *C. tetani* *C. botulinum* *C. tetanomorphum*	26 25-26 26-28 25-28
	Fermentan aminoácidos tricarbonados (por ejemplo alanina) a propionato, acetato y CO_2	*C. propionicum*	35
III. Fermentación de carbohidratos o aminoácidos	Productos de fermentación a partir de glucosa: formato, pequeñas cantidades de isobutirato e isovalerato	*C. bifermentans*	27
IV. Fermentación de purinas	Fermentan ácido úrico y otras purinas para dar Acetato, CO_2 y NH_3	*C. acidurici*	27-30
V. Fermentación de etanol hasta ácidos grasos	Produce butirato, caproato e H_2; requiere acetato como aceptor de electrones. No utilizan azúcares ni aminoácidos ni purinas	*C. kluyveri*	30

también acetona y butanol (en tiempos pretéritos la bioindustria de producción de estos disolventes por clostridios fue muy importante); algunos representantes de este grupo son capaces de fijar nitrógeno, siendo el más vigoroso *C. pasteurianum*, el cual probablemente es el responsable de la mayor parte del nitrógeno fijado en anaerobiosis en el suelo. Un grupo de clostridios fermenta la celulosa con la formación concomitante de ácidos y alcoholes, de modo que se piensa que en anaerobiosis estos organismos son los principales implicados en la degradación de la celulosa.

Se conocen bien los pasos y la bioquímica implicados en la génesis de ácido butírico y butanol a partir de azúcares (Figura 12.58). La glucosa se convierte en butirato a través de Embden-Meyerhof y el piruvato es roto en acetil-CoA e hidrógeno por la reacción fosforoclástica (Sección 17.19 y Figura 17.51). El acetil coA es entonces reducido a productos de fermentación utilizando para ello el NADH derivado de la ruta glucolítica. La proporción de los diferentes productos está influenciada por la duración y las condiciones de las fermentaciones. En los estadios iniciales, los productos predominantes son los ácidos acético y butírico, pero a medida que cae el pH de la fermentación, cesa la síntesis de los ácidos y comienza la de acetona y butanol que son neutros. Sin embargo, si el pH se mantiene en la zona neutra con ayuda del $CaCO_3$, se produce muy poco de los productos neutros constituyendo entonces tres cuartas partes el butírico y una parte el ácido acético. Esto tiene bastante sentido fisiológico porque, al contrario que la formación de productos neutros, la producción de ácidos permite síntesis adicional de ATP (Figura 12.58).

Otro grupo de clostridios obtiene su energía por la fermentación de *aminoácidos*: algunas especies fermentan parejas de aminoácidos en lo que se conoce como **reacción de Stickland**. Un aminoácido sirve como donador de electrones y es oxidado mientras que el otro acepta los electrones y es reducido. Por ejemplo *Clostridium sporogenes* es capaz de catabolizar una mezcla de glicocola y alanina (Figura 12.59). Parejas de aminoácidos que cumplen con la reacción

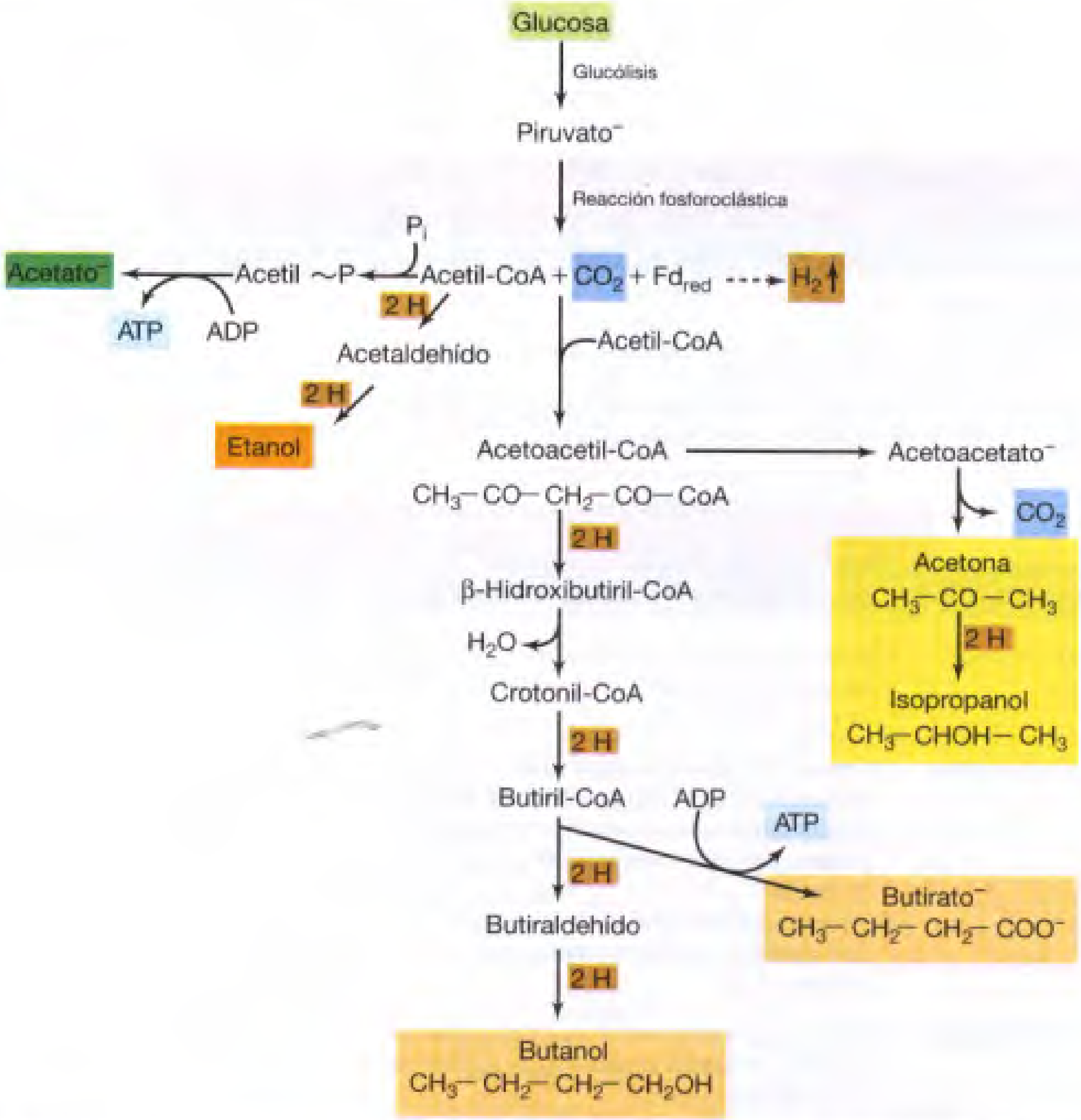

Glucosa
Glucólisis
Piruvato⁻
Reacción fosforoclástica
Pᵢ
Acetato⁻
Acetil ~P
Acetil-CoA + CO₂ + Fd_red
H₂
ATP
ADP
2 H
Acetaldehído
2 H
Etanol
Acetil-CoA
Acetoacetil-CoA
CH₃–CO–CH₂–CO–CoA
Acetoacetato⁻
CO₂
Acetona
CH₃–CO–CH₃
2 H
Isopropanol
CH₃–CHOH–CH₃
2 H
β-Hidroxibutiril-CoA
H₂O
Crotonil-CoA
2 H
Butiril-CoA
ADP
ATP
2 H
Butirato⁻
CH₃–CH₂–CH₂–COO⁻
Butiraldehído
2 H
Butanol
CH₃–CH₂–CH₂–CH₂OH

Figura 12.58 Ruta de formación de productos de fermentación por el grupo del ácido butírico de clostridios. La designación «2H» representa dos electrones de una molécula de NADH. Nótese cómo la producción de acetato y butirato lleva a producción adicional de ATP por fosforilación de sustrato. (*véase* Sección 17.19). Por el contrario, la formación de butanol y acetona (estos productos se encuentran en relación 1:1) debido a que la formación de butanol requiere dos NADH, mientras que la de acetona requiere una), reduce el rendimiento de ATP porque no se realiza el paso de butiril-CoA a butirato.

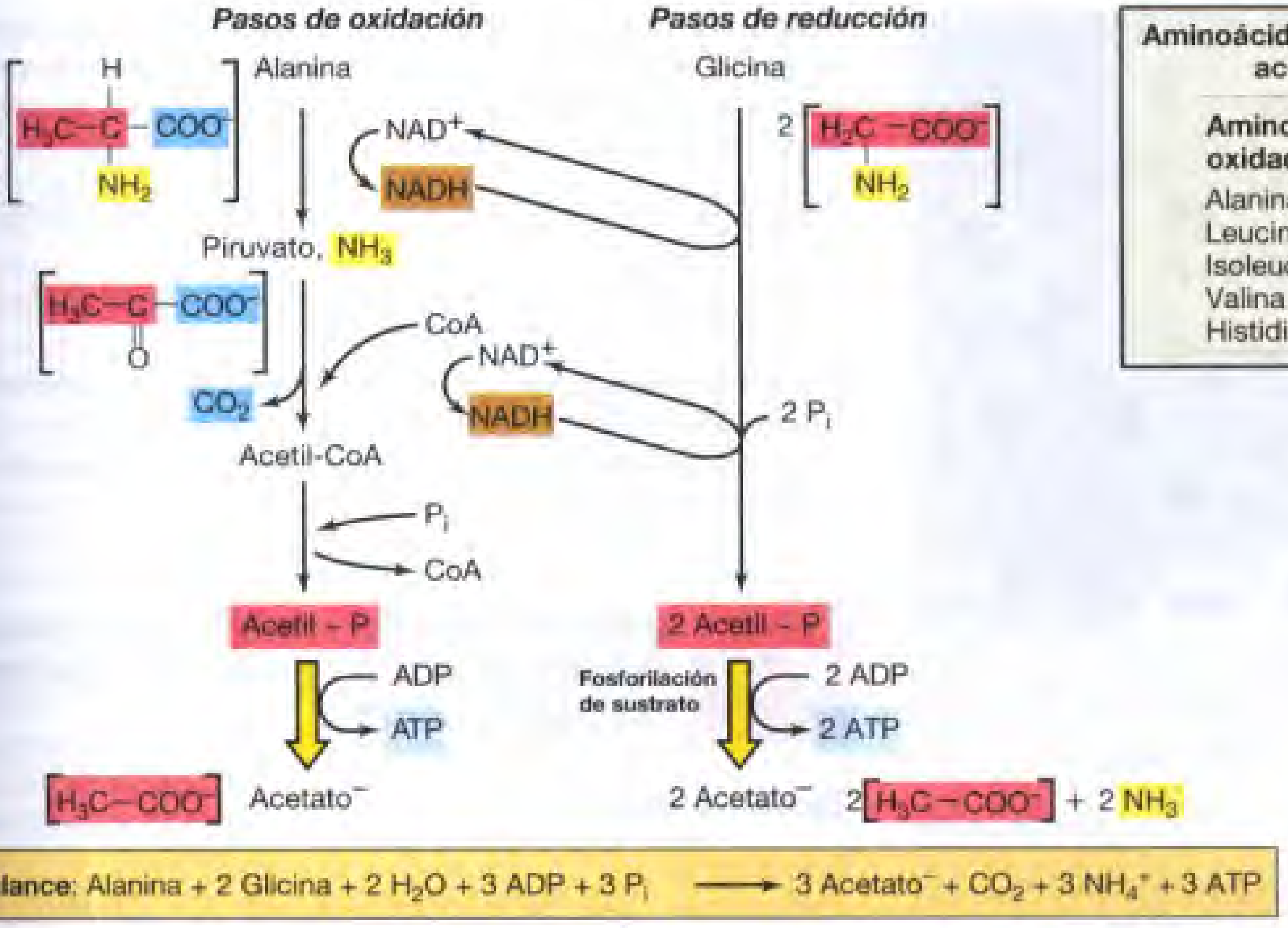


Figura 12.59 Reacción acoplada de oxidación-reducción (reacción de Stickland) entre alanina y glicina en *Clostridium sporogenes*. Se muestra la estructura (entre corchetes) de los sustratos clave, intermediarios y productos para permitir seguir la química de las reacciones. Nótese que en la reacción mostrada, la alanina es el *donador* de electrones mientras que la glicina es el aceptor de electrones.

Aminoácidos que participan en la fermentación acoplada (reacción e Stickland)

Aminoácidos oxidados:	Aminoácidos reducidos:
Alanina	Glicina
Leucina	Prolina
Isoleucina	Hidroxiprolina
Valina	Triptófano
Histidina	Arginina

de Stickland se incluyen también en la figura. Los productos de la oxidación de Stickland son siempre NH_3, CO_2 y ácido carboxílico con *un átomo de carbono menos* que el aminoácido que fuera oxidado (Figura 12.59)

Los aminoácidos que pueden ser fermentados por sí solos incluyen: alanina, cisteína, glutamato, glicina, histidina, serina o treonina. Los productos son generalmente acetato, butirato, CO_2 y H_2. Muchos de los productos de fermentación originados por los clostridios son malolientes, de modo que el olor a putrefacción suele por sí mismo revelar la presencia de clostridios fermentadores. Además de butírico, existen otros compuestos como el ácido isobutírico, ácido isovalérico, ácido caproico, ácido sulfídrico, metilmercaptano (derivados de aminoácidos azufrados), cadaverina (derivados de la lisina), putrescina (de la ornitina) y amoníaco.

El hábitat principal de los clostridios es el suelo, donde viven en zonas anóxicas; la anoxia es producida por microorganismos facultativos que metabolizan diversos compuestos orgánicos presentes. Unos cuantos clostridios se han adaptado al ambiente anóxico del tracto intestinal de los mamíferos. También y como se discute en la Sección 21.8, algunos clostridios producen serias enfermedades en humanos. El botulismo es producido por el *Clostridium botulinum*, el tétanos por *Clostridium tetani* y la gangrena gaseosa por *Clostridium perfringens* y especies relacionadas. Estas especies patógenas no son muy diferentes, metabólicamente hablando, del resto, pero son capaces de producir toxinas muy potentes (Sección 21.10 y Tabla 21.4). *C. perfringens* y relacionados pueden también dar lugar a gastroenteritis en humanos y animales (Sección 29.5) y el botulismo puede darse también en patos, ovejas y otros animales domésticos. Un problema ecológico, todavía sin respuesta, es el papel que estas toxinas desempeñan en los ambientes naturales de los microorganismos.

Sporosarcina

El género *Sporosarcina* es único entre los esporoformadores por ser cocos en lugar de bacilos. Son microorganismos aerobios estrictos, esféricos u ovalados que se dividen en dos planos perpendiculares para formar los paquetes cúbicos de células (Figura 12.60). Tiene dos especies, *S. ureae* y *S. halophila*. *S. ureae* (Figura 12.60) puede ser fácilmente enriquecida a partir del suelo por siembra de diluciones de muestras de suelo pasteurizadas en agar nutritivo suplementado con 8% de urea e incubación en aerobiosis. La mayoría de las bacterias del suelo se ven fuertemente inhibidas por un 2% de urea. Sin embargo, la especie *S. ureae* descompone la urea hasta CO_2 y NH_3 y al hacerlo eleva drásticamente el pH del medio (*S. ureae* es alcalino tolerante y crece en medios hasta pHs 10-11). *S. ureae* es común en suelos y estudios recientes sugieren que los suelos que reciben aportes de orina, tales como los suelos en los que los animales normalmente orinan periódicamente, están enriquecidos con el microorganismo. Como la mayoría de los microorganismos del suelo son muy sensibles a la urea, esto sugiere que *S. ureae* debe ser la principal fuente de gradación de la urea en la naturaleza.

Heliobacterias

Las heliobacterias son fototrópicas, Gram positivas de bajo contenido en GC. Son fototrofos anoxigénicos y producen

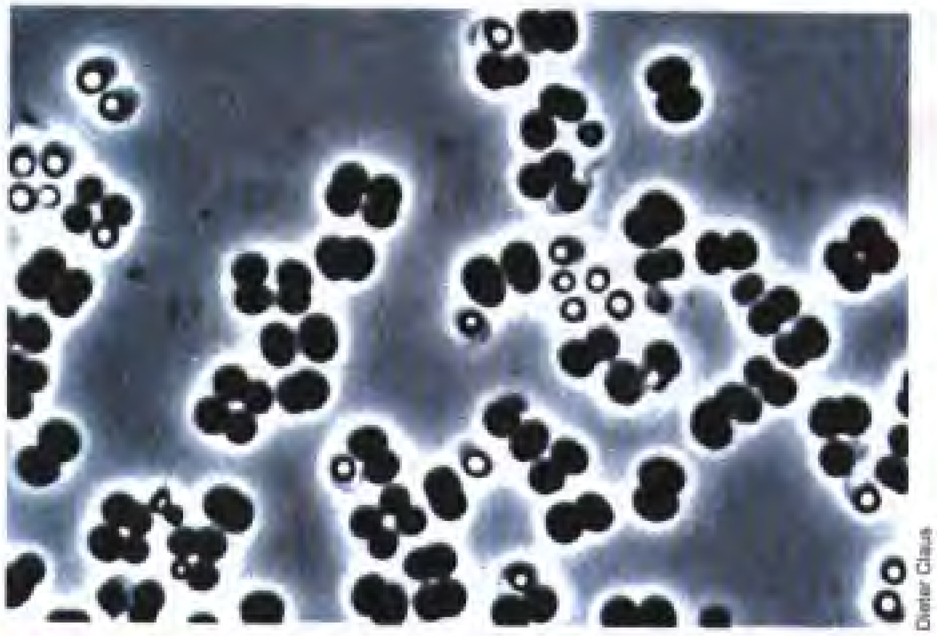


Figura 12.60 Micrografía de contraste de fases de *Sporosarcina ureae*. El diámetro de las células es de 2 μm. Nótense las endosporas refráctiles. La mayoría de los paquetes celulares contienen 8 células.

una forma única estructural de bacterioclorofila (Sección 17.2). El grupo contiene cuatro géneros: *Heliobacterium*, *Heliophilum*, *Heliorestis* y *Heliobacillus*. Todas la heliobacterias conocidas son bacilares, bacilos cortos o largos; incluso con extremos ligeramente puntiagudos (Figura 12.61). *Heliophilum* es especialmente interesante porque sus células en forma de coco se agrupan en racimos (Figura 12.61*b*), moviéndose como una unidad. Son anaerobios estrictos y a pesar de ser fotoautotróficos, pueden crecer en la oscuridad por fermentación de piruvato (como pueden hacerlo muchos clostridios, parientes de las heliobacterias). Las esporas de las heliobacterias contienen mucho Ca^{2+} y ácido dipicolínico como *Bacillus* o *Clostridium* (*véase* Sección 4.15). El hábitat primario es el suelo de zonas arroceras, en los que la actividad fijadora de nitrógeno puede beneficiar la productividad agrícola.

✓ 12.19-12.20 Revisión de conceptos

Las bacterias Gram positivas de bajo contenido en GC constituyen un grupo filogenético grande que contiene cocos o bacilos, esporoformadores y no esporulantes. La producción de endosporas es la característica más importante de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*. Las bacterias Gram positivas son los principales agentes para la degradación de materia orgánica en el suelo y solamente unas pocas son patógenas.

- ✓ ¿Cuáles son las principales características para diferenciar *Staphylococcus* y *Bacillus*?
- ✓ ¿Cómo puede diferenciar entre una bacteria del ácido láctico homofermentativa o heterofermentadora?
- ✓ ¿Cuál es el principal distintivo fisiológico entre especies de *Bacillus* y *Clostridium*?
- ✓ Entre géneros endosporoformadores, ¿Qué es distintivo en las heliobacterias?

12.21 *Bacteria* Gram positivas sin pared celular con bajo contenido en GC: los micoplasmas

Géneros clave

Mycoplasma
Spiroplasma

Los micoplasmas son organismos sin pared celular que nunca revierten a una forma con pared celular. Posiblemente sean los organismos más pequeños capaces de llevar a cabo una vida autónoma y son muy interesantes, evolutivamente hablando, por sus genomas que son muy pequeños y por su simple estructura celular. Aunque no se tiñen como Gram positivas porque carecen de pared celular, filogenéticamente están claramente relacionadas con las bacterias Gram positivas de bajo contenido en GC.

Propiedades de los micoplasmas

La ausencia de paredes celulares en los micoplasmas que se veía por microscopía electrónica, se confirma por el análisis químico, ya que no se detectan moléculas de ácido murámico, o diaminopimélico. En el capítulo 4 se discutió cómo los protoplastos pueden generarse a partir de células por acción de enzimas líticos y en un medio osmóticamente estabilizado y de cómo al añadir agua, éstos la toman masivamente conduciendo a la explosión y muerte celular (Figura 4.33). Los micoplasmas se parecen

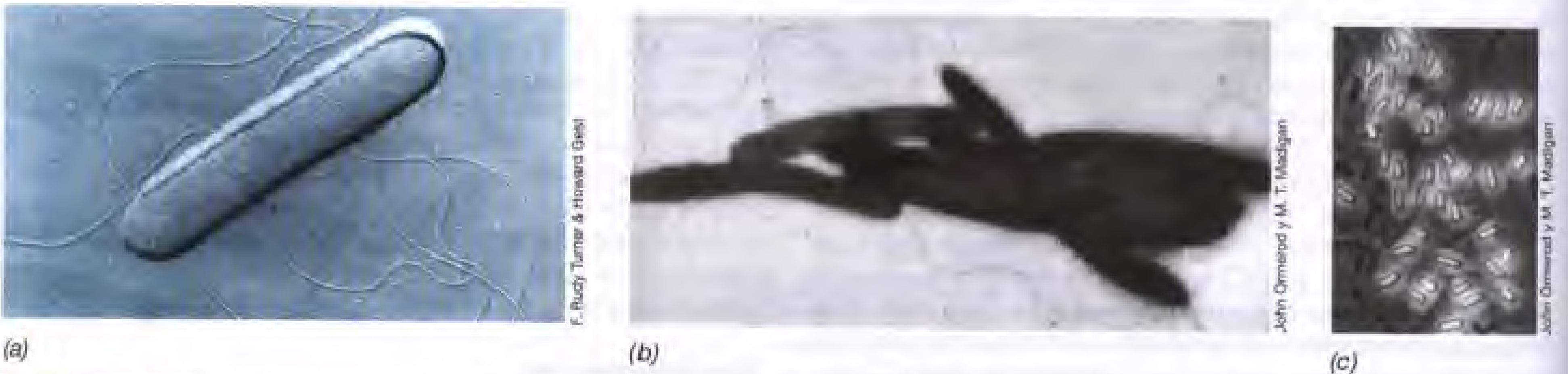

F. Rudy Turner & Howard Gest
John Ormerod y M. T. Madigan
John Ormerod y M. T. Madigan
(a)
(b)
(c)

Figura 12.61 Células y endosporas de heliobacterias. (a) Micrografía electrónica de *Heliobacillus mobilis* con flagelación peritrica. (b) *Heliophilum fasciatum* observado por microscopía electrónica. (c) Microscopía de contraste de fases de esporas de *Heliobacterium gestii*.

a los protoplastos en el sentido de que carecen de pared celular, aunque son más resistentes a la lisis osmótica y sobreviven a condiciones en las que los protoplastos mueren. Esto es debido, en parte, a la presencia de esteroles en la membrana citoplasmática de los micoplasmas, haciéndola más resistentes que la de otros procariotas. De hecho algunos micoplasmas requieren esteroles para crecer; este requerimiento se utiliza en su taxonomía para separarlos en dos grupos (Tabla 12.28).

Además de los esteroles, ciertos micoplasmas contienen compuestos llamados **lipoglicanos** (Tabla 12.28). Los lipoglicanos son heteropolisacáridos de cadena larga covalentemente unidos a la membrana (embebidos) de muchos micoplasmas. Los lipoglicanos se parecen a los lipopolisacáridos (*LPS*) de las bacterias Gram negativas (Sección 4.9) pero sin lípido A y fosfatos. Los lipoglicanos funcionan también como estabilizadores de la membrana y de puntos de unión de los micoplasmas a soportes sólidos y de células superiores. Como los LPS, los lipoglicanos estimulan la producción de anticuerpos cuando se inyectan en animales de experimentación.

Crecimiento de los micoplasmas

Las células de micoplasmas son pequeñas y muy pleomórficas, una consecuencia que se deriva de carecer de pared celular y por tanto de rigidez. Cuando se cultivan es frecuente que aparezcan como elementos cocoides, alargados incluso hifas muy ramificadas (Figura 12.62).

Los elementos cocoides (0,2-0,3 μm) son las formas más pequeñas capaces de llevar vida libre y autónoma. Otras formas más pequeñas que aparecen con frecuencia no poseen viabilidad. El tamaño del genoma es muy pequeño (500-1100 kilopares de bases de DNA, semejante al de las clamidias y riquetsias) (Secciones 12.27 y 12.13) y sólo de un quinto a un cuarto del de *Escherichia Coli*. El genoma de al menos una de sus especies, *M. genitalium*, contiene 580 kilopares de bases (kpb) y ha sido ya completamente secuenciado (Sección 15.3). Este genoma es tan pequeño que actualmente se piensa que probablemente sea el límite inferior para la vida autónoma en un ser vivo.

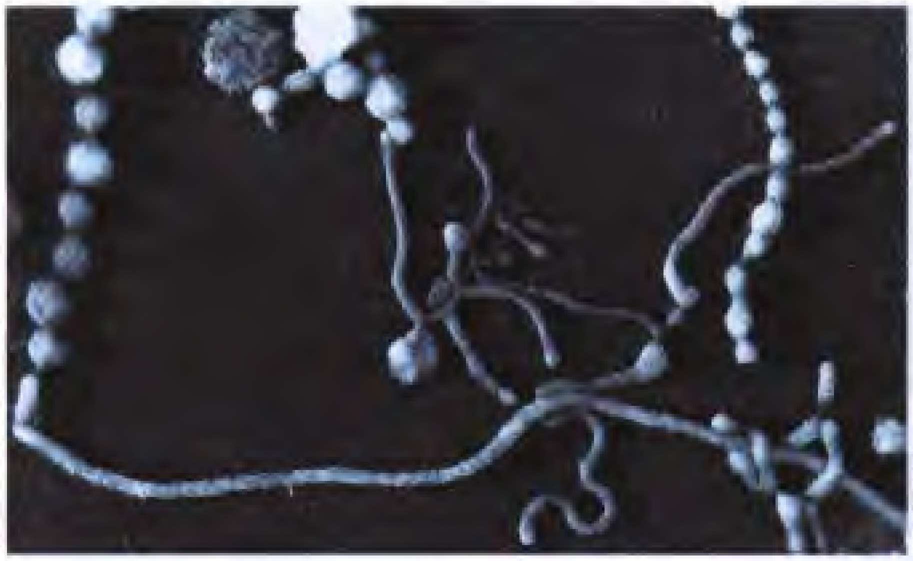


Figura 12.62 Micrografía electrónica (sombreado metálico) de *Micoplasma mycoides*. Nótense los elementos cocoides e hifas. El diámetro medio de las formas cocáceas es de 0,5 μm.

Alan Rodwell

El modo de crecimiento de los micoplasmas difiere, ya sea crecimiento en medio sólido o en medio líquido. En medio con agar tienen tendencia a embeberse del medio circundante y las colonias tienen una morfología típica de «huevo frito», apariencia debido a la presencia de un área central que se hunde en el agar y de una zona circundante más fina, menos densa y de color más tenue (Figura 12.63). Como era de esperar, el crecimiento de los mico-

TABLA 12.28 Características principales de los micoplasmas[a]

Género	Número especies	Propiedades	DNA (GC mol %)	Tamaño de genoma (pares kilobases)	Presencia lipoglicanos
Requieren esteroles					
Mycoplasma	110	Muchos patógenos; requieren esteroles; aerobios facultativos (*véase* Figura 12.62)	23-41	600-1350	+
Anaeroplasma	4	Pueden requerir o no esteroles; anaerobios estrictos; degradan almidón; producen acético, láctico, fórmico, etanol y CO_2;	29-33	1500-1600	+
Spiroplasma	33	Células espirales en sacacorchos; fitopatógenos(Figura 12.64)	25-30	940-2200	
Ureaplasma	6	Cocoides, agrupados o en cadenas cortas; crecimiento óptimo a pH 6.0 ureasa positiva; infecciones urinarias en humanos inhibido por el acetato de talio	27-30	750	– –
Entomoplasma	5	Aerobios facultativos; asociados con insectos y plantas	27-29	790-1140	?
No requieren esteroles					
Acholeplasma	16	Aerobios facultativos	27-36	1500	+
Asteroleplasma	1	Anaerobio estricto; del rumen bovino y ovino	40	1500	+
Mesoplasma	12	Filogenética y ecológicamente relacionado con *Entomoplasma*	27-30	870-1100	?

[a] Filogenéticamente todas los micoplasmas conocidos son miembros del grupo de *Bacteria* Gram positivas con bajo contenido en GC.

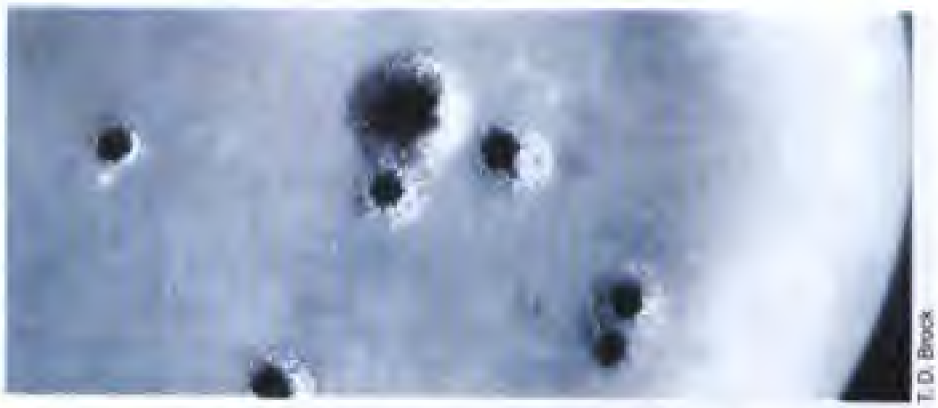

T.D. Brock

Figura 12.63 Colonias típicas de micoplasmas en forma de «huevo frito». El diámetro es de 0,5 mm.

plasmas no se ve afectado por la penicilina, cicloserina u otros antibióticos que inhiben el desarrollo normal de la pared celular.

Los medios de cultivo para crecimiento de los micoplasmas han sido tradicionalmente bastante complejos. Para la mayoría de las especies, el crecimiento es muy pobre en medios típicos que contengan extracto de levadura, peptona, extracto de corazón etc., a no ser que se añada suero fresco o líquido ascítico; este último proporciona una buena fuente de ácidos grasos insaturados y esteroles. Algunos micoplasmas pueden ser cultivados en medios relativamente simples, de modo que se han definido algunos medios para trabajos de laboratorio. La mayoría utilizan carbohidratos como fuente de carbono y energía y requieren bastantes vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas. El metabolismo energético de los micoplasmas es variable pero no es único; algunas especies son respiradoras estrictas mientras que otras son facultativas y otras anaerobias (Tabla 12.28).

Spiroplasma

El género *Spiroplasma* consiste de células helicoidales (Figura 12.64). Aunque carecen de pared celular y de flagelos, son móviles por medio de un movimiento que recuerda a un sacacorchos. Se han visto fibrillas internas que pueden estar implicadas en el movimiento. Se ha aislado de la hemolinfa e intestino de insectos (Figura 12.64) y de plantas vasculares y de los insectos que se alimentan de savia. *Spiroplasma citri* se ha aislado de la superficie de hojas de los cítricos en los que causa una enfermedad. Por microscopía electrónica se han detectado estructuras que recuerdan a los espiroplasmas en otras plantas como el maíz; por ello se cree que existe un grupo amplio y diverso de micoplasmas que afectan al reino vegetal. Se han descrito también algunas especies de *Spiroplasma* que afectan al reino animal, tales como las que producen la *espiroplasmosis de la abeja de la miel, la catarata del ratón lactante y la enfermedad letárgica del escarabajo Melolontha.*

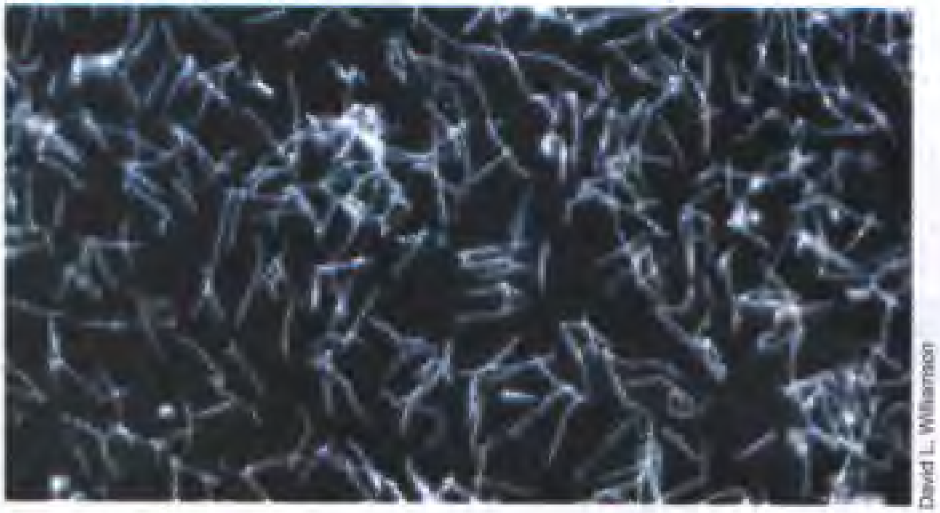

David L. Williamson

Figura 12.64 Micrografías de campo oscuro de un espiroplasma de la hemolinfa de la mosca *Drosophila pseudoobscura*. Las hembras infectadas con esta bacteria solamente dan lugar a hembras. Diámetro celular de 0,15 µm.

✓ 12.21 Revisión de conceptos

Los micoplasmas son un grupo de organismos que carecen de pared celular y tienen un genoma pequeño. Muchas de sus especies requieren esteroles que dan consistencia a sus membranas y varias de ellas son patógenas para hombres y otros animales.

- ✓ ¿Por qué necesitan los micoplasmas tener las membranas más fuertes que el resto de los procariotas?
- ✓ ¿A qué grupo filogenético pertenecen los micoplasmas?
- ✓ Compare y contraste el género *Micoplasma* con *Acholeplasma* en términos de requerimientos nutricionales, tamaño de genoma y metabolismo.

12.22 *Bacteria* Gram positivas con alto contenido en GC: corineformes y *Bacteria* del ácido propiónico

Géneros clave

Corynebacterium
Arthrobacter
Propionibacterium

Las bacterias de este grupo son fundamentalmente bacilares con tendencia a filamentar a medida que aumenta el desarrollo evolutivo de sus miembros. Son habitantes típicos del suelo y de material vegetal. La inmensa mayoría son saprofitos sin ningún peligro para hombres y animales, excepto algunas pocas especies como *Corynebacterium diphteriae* o *Mycobacterium tuberculosis*. Algunos son incluso de un enorme interés par la producción de antibióticos, aminoácidos, vitaminas, agentes saborizantes y derivados lácteos como es el caso de *C. glutamicum*. Empezaremos con los que presentan morfología bacilar.

Corinebacterias

Las bacterias corineformes son Gram positivas, aerobias, inmóviles, bacilares con tendencia a la irregularidad, extremo(s) abultado(s) y forma de porra característica o incluso en forma de «V». Esta última forma se debe a un pequeño movimiento de ruptura infructuoso de la división binaria que no consigue separar a las dos células que quedan unidas (Figura 12.65). Esto se debe a la existencia de dos zonas celulares con índices de fractura diferentes en la pared celular y solamente la capa más interna participa en la formación del tabique de separación, de modo que al final las dos células permanecen unidas por la capa externa. Cuando esta capa externa se rompe en un punto, el resultado es que las células se doblan por el mínimo punto de tensión dando la típica forma de «V» (Figura 12.66).

Los géneros más importantes del grupo corineforme son *Corynebacterium* y *Arthrobacter.* El primero consiste de un diverso grupo de especies, incluidas las patógenas de animales y de plantas, así como las saprofitas; de entre las patógenas destaca *C. diphteriae*, agente etiológico de la difteria humana (Sección 26.3). El género *Arthrobacter*, consiste fundamentalmente de estirpes procedentes del suelo; se distingue de *Corynebacterium* sobre la base de su ciclo biológico que implica fases alternativas entre formas cocáceas y bacilares (Figura 12.67). Sin embargo, algunas corinebacterias son pleomórficas y pueden formar elementos cocoides durante el crecimiento, de modo que la distinción entre ambos géneros por el ciclo no es en modo alguno absoluta. El género *Corynebacterium* con mucha frecuencia tiene un extremo aporrado (de hecho *koryne* en griego significa porra o garrote).

Las especies del género *Arthrobacter* son comunes en el suelo y son bastantes resistentes a la desecación y deprivación nutricional, a pesar de que son incapaces de formar esporas de resistencia. Constituyen un grupo heterogéneo con versatilidad nutricional. Se han aislado cepas que descomponen los herbicidas, cafeína, nicotina, fenoles y otros compuestos orgánicos inusuales.

Bacterias del ácido propiónico

Las bacterias del ácido propiónico (Género *Propionibacterium*) fueron inicialmente descubiertos como comensales de los quesos suizos tipo Emmental en los que produce, debido al CO_2, los típicos agujeros; la presencia de estas bacterias es, en parte, la responsable del sabor de estos quesos. Aunque el ácido propiónico es también producido por otros grupos bacterianos, solamente este grupo lo hace en estas cantidades. Son Gram positivos anaerobios que fermentan el láctico, carbohidratos y diversos alcoholes, produciendo primariamente el mencionado ácido propiónico,

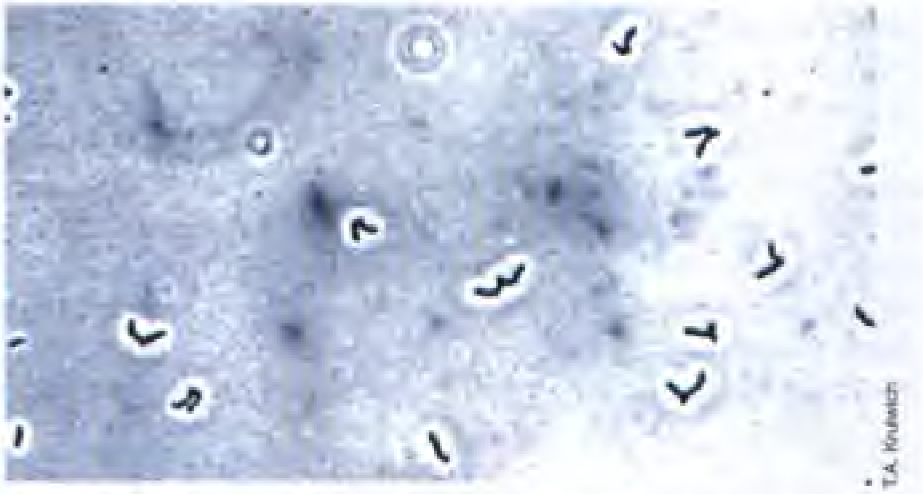
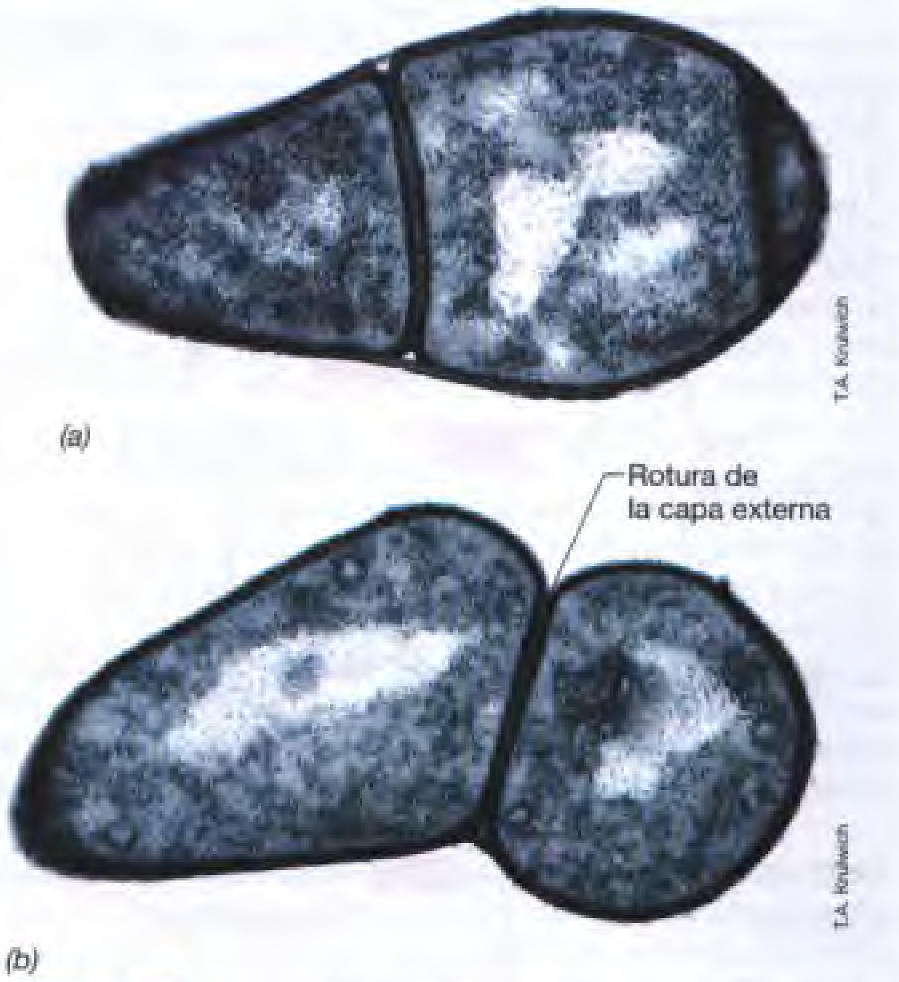

T.A. Krulwich

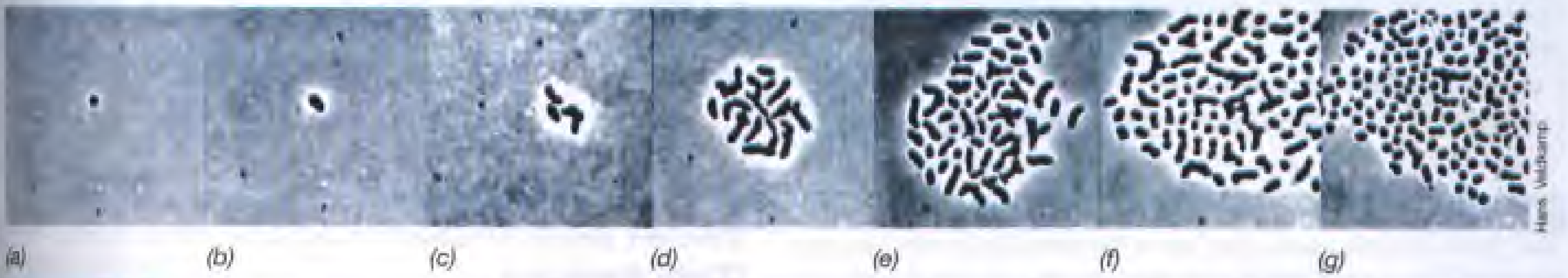
Figura 12.65 Micrografía mostrando la forma característica en «V» de *Arthrobacter crystallopoietes* que resulta de una citocinesis asimétrica en un lado de la célula. Diámetro celular de 0,9 µm.



T.A. Krulwich

T.A. Krulwich

Figura 12.66 Micrografía electrónica de la división celular de *Arthrobacter crystallopoietes* mostrando la división asimétrica y la aparición de células en forma de «V». (a) Antes de la rotura de la parte externa de la pared celular y (b) después de la rotura. Diámetro celular de 0,9-1 µm.

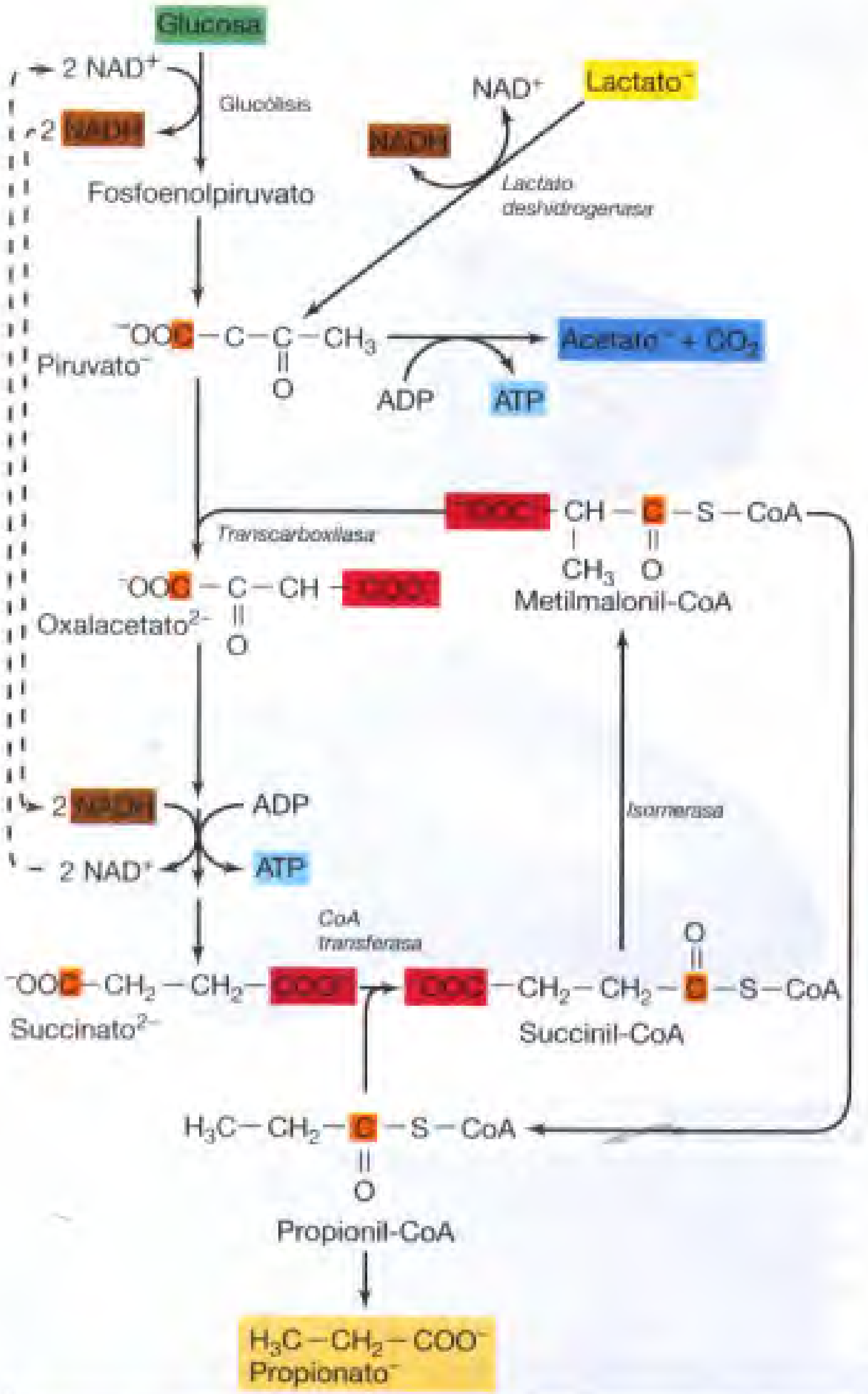


Hans Veldkamp

Figura 12.67 Estadios del ciclo biológico de *Arthrobacter globiformis* como se observa en un cultivo en portaobjetos. (a) Elemento cocoide. (b-e) conversión a bacilo y crecimiento de una colonia compuesta principalmente de bacilos. (f-g) conversión a formas cocoides. Diámetro celular de 0,9 µm.

pero también CO_2 y ácido acético. Sus requerimientos nutricionales son complejos y normalmente crecen bastante despacio.

La Figura 12.68 refleja la ruta bioquímica que conduce en las bacterias del ácido propiónico desde la glucosa hasta este ácido. El catabolismo inicial de la glucosa sigue la ruta de Embden-Meyerhof como en las bacterias del ácido láctico, pero el NADH formado se oxida en parte en la ruta del ácido propiónico. El piruvato acepta un grupo carboxílico a partir de metilmalonil-CoA por acción de una transcarboxilasa, lo que conduce a la formación de oxalacetato y de propionil-CoA. El último reacciona con el succinato en un paso catalizado por la CoA transferasa, lo que origina succinil-CoA y propionato. El succinil-CoA es entonces isomerizado a metilmalonil-CoA completándose así el ciclo (Figura 12.68). La oxidación del NADH ocurre en los pasos entre oxalacetato y succinato, restaurándose el balance de óxido-reducción.



Estequiometría del lactato:

$$3\ \text{Lactato}^- \longrightarrow 2\ \text{Propionato}^- + 1\ \text{Acetato}^- + 1\ CO_2 + 3\text{–}5\ \text{ATP}$$

Figura 12.68 Formación de ácido propiónico por *Propionibacterium*. Tanto el lactato producido por la fermentación de otras bacterias, como la glucosa pueden ser fermentados en la fermentación propiónica. La génesis de ATP está asociada con reacciones de transporte de electrones durante la formación de succinato y por fosforilación a nivel de sustrato en la producción de acetato.

Propionibacterium también fermenta el lactato con la producción de propionato, acetato y CO_2. Esta fermentación anaerobia de lactato a propionato es de interés porque el lactato a su vez es el producto final de la fermentación de muchas bacterias (*véase* Sección 12.19). Por tanto las bacterias del ácido propiónico son capaces de obtener energía anaeróbicamente a partir de un producto de fermentación generado por otras bacterias; esta estrategia se ha llamado *fermentación secundaria*. Precisamente es esta fermentación la importante en la elaboración del queso suizo. El cultivo iniciador es una mezcla de lactobacilos y estreptococos fermentadores más bacterias del ácido propiónico. Después de que la masa quesera se ha estrujado, las bacterias propiónicas se desarrollan rápidamente formándose los típicos ojos de los quesos, debido a la difusión del CO_2 por la masa quesera que tiende a acumularse en los puntos más débiles de la misma. En la fermentación, el lactato es oxidado hasta piruvato del que se genera el ácido propiónico, como se indica en la Figura 12.68.

El propionato también puede formarse por fermentación del succinato como en el caso del género *Propionigenium*. Este organismo no está relacionado ni filogenética ni ecológicamente con *Propionibacterium*, pero algunos aspectos de esta fermentación tienen considerable interés. En la Sección 17.20 se discuten algunos aspectos de esta fermentación.

12.23 *Bacteria* Gram positivas con alto contenido en GC: *Mycobacterium*

Géneros Clave

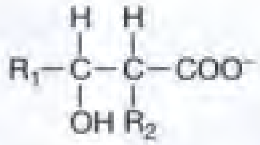
Mycobacterium

El género Mycobacterium son bacilos, que en algún momento de su ciclo biológico tienen la propiedad de ser **ácido alcohol resistente** (AAR). Esta propiedad es debida a la presencia en la superficie de la micobacteria de unos componentes lipídicos únicos denominados **ácidos micólicos** y se encuentran solamente en el género *Mycobacterium*. Fueron descubiertos por Robert Koch en sus trabajos pioneros sobre la tuberculosis; la propiedad de ser AAR permite un diagnóstico rápido en lesiones tuberculosas y ha significado sin duda una gran ayuda para la definición del género *Mycobacterium*.

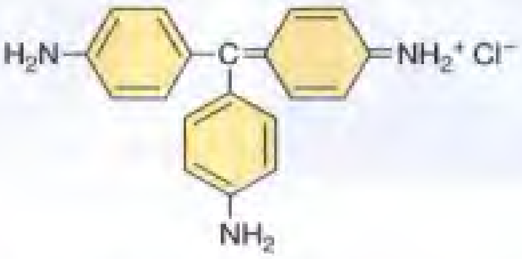
Tinción ácido alcohol resistente (Ziehl-Neelsen)

Se usa una mezcla de fuchsina básica y fenol (fuchsina fenicada) en el procedimiento de tinción, usando calentamiento lento pero progresivo para conseguir que el colorante entre dentro de las células durante 2-3 minutos. El papel del fenol es facilitar la penetración del fenol en la capa lipídica. Una vez lavado con agua destilada, la preparación se decolora con ácido y alcohol; después de otro lavado se da una coloración final con azul de metileno. Las bacterias **AAR** aparecen como **rojas**, mientras que el fondo de la preparación y las bacterias que no son AAR aparecen de color azul.

Como se ha indicado, el componente responsable de este peculiar comportamiento es el ácido micólico que es un hidroxilípido de cadena larga y ramificado (Figura 12.69*a*). La reactividad radica en su grupo carboxilo que reacciona con el ion amonio de la fuchsina (Figura 12.69*b*). Eventualmente estos lípidos se unen al péptido glucano de la pared celular con lo que ésta adquiere una clara consistencia lipídica. Las micobacterias no se tiñen por el método de Gram precisamente debido a este material lipídico; si el lípido se extrae con etanol, las células resultantes ya no son AAR sino Gram positivas normales.



(*a*) Ácido micólico; R_1 y R_2 son hidrocarbonos alifáticos de cadena larga



(*b*) Fuchsina básica

Figura 12.69 Estructura del (a) ácido micólico y (b) fuchsina básica, colorante en la tinción de ácido alcohol resistentes. La fuchsina se combina con el ácido micólico a través de enlaces iónicos entre COO^- y NH_2^+.

Características de las micobacterias

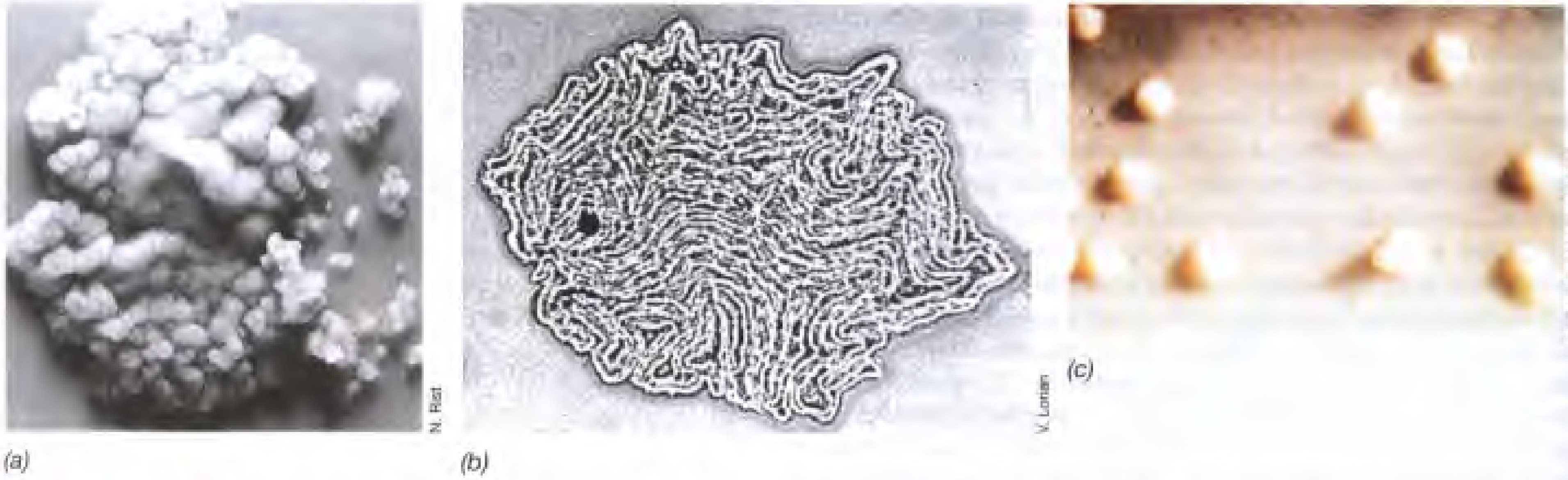
Las micobacterias son bastante pleomórficas y pueden llevar a cabo, bajo ciertas circunstancias, un crecimiento ramificado. Sin embargo y cuando hacen esto, las ramificaciones se rompen (al contrario que en los actinomicetos (Sección 12.24)) generando células bacilares normales; por todo ello se dice que las micobacterias no generan un micelio verdadero. Se pueden separar en dos grandes grupos, de *crecimiento lento* y de *crecimiento rápido* (Tabla 12.29). *Mycobacterium tuberculosis* es un típico de crecimiento lento, de modo que colonias aparentes solamente se visualizan en placa después de varios días, incluso semanas (depende de la cepa) de incubación. (La razón del éxito de Koch, fue su paciencia pues esperó suficientemente hasta que vio las colonias; Sección 1.5). Cuando crecen en medio sólido, las micobacterias forman generalmente colonias apretadas y arrugadas que se elevan sobre la placa en lugar de extenderse por la superficie (Figura 12.70*a*). Esta formación es probablemente debida al alto contenido lipídico y a la naturaleza hidrofóbica de la superficie celular.

La mayor parte de las micobacterias tienen relativamente requerimientos nutricionales simples. El crecimiento normalmente ocurre en medios de sales minerales simples con amoníaco como fuente de nitrógeno y glicerol o acetato como fuente de carbono y donador de electrones en aerobiosis. El crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* es estimulado por lípidos, ácidos grasos, yema de huevo (una buena fuente de lípidos) que pueden añadirse al medio de cultivo para conseguir crecimientos más rápidos. El medio de Lowestein-Jensen (Glicerol + huevo completo) es el medio habitual para el aislamiento primario de este microorganismo en lesiones patológicas. Quizás debido al alto contenido lipídico en sus paredes celulares, es por lo que resiste al álcali o fenol durante periodos de tiempo considerables; esta propiedad se utiliza para el aislamiento del microorganismo a partir de esputos de pacientes. El esputo se trata con 1N NaOH durante 30 minutos y después de neutralizada la sosa, se siembra sobre el medio de aislamiento.

Una característica de muchas micobacterias es su capacidad de formar pigmentos carotenoídicos amarillos (Figura 12.70*c*). Basado en su pigmentación, las micobacterias pueden clasificarse en tres grupos: no pigmentadas (incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*); las que forman

TABLA 12.29 Algunas características de micobacterias representativas

Especie	Crecimiento en NaCl al 5%	Reducción de nitrato	Crecimiento a 45°C	Patógeno de humanos	Pigmentación
De crecimiento lento					
Mycobacterium tuberculosis	–	+	–	+	Ninguna
Mycobacterium avium	–	–	–	+	Colonias viejas pigmentadas (Figura 12.70*c*)
Mycobacterium bovis	–	–	+	+	Ninguna
Mycobacterium kansasii	–	+	–	+	Fotocromogénico
De crecimiento rápido					
Mycobacterium smegmatis	+	+	+	–	Ninguna
Mycobacterium phlei	+	+	+	–	Pigmentado
Mycobacterium chelonae	+	–	–	+	Ninguna
Mycobacterium parafortuitum	+	+	–	–	Fotocromogénico



N. Rist

V. Lorian

Centers for Disease Control

Figura 12.70 Morfología característica de las colonias de micobacterias. (a) *Mycobacterium tuberculosis* mostrando la apariencia compacta y arrugada de la colonia. Diámetro de la colonia 7 mm. (b) Colonia de cepa patógena de *M. tuberculosis* en fase temprana mostrando el crecimiento típico «en cuerda». Las células individuales tienen un diámetro de 0,5 μm (Véanse también los dibujos de esta bacteria realizados por Robert Koch, Figura 1.13). (c) Colonias de *M. avium* aislado como patógeno oportunista de un paciente de SIDA.

pigmentos solamente en presencia de luz (fotocromogénicas; *M. kansasii, M. marinum*) y las que forman pigmentos incluso en la oscuridad (escotocromogénicas; *M. gordonae, M. paraffinicum*). La fotoinducción implica, como es habitual en los seres vivos, a la luz azul y al oxígeno. La evidencia actual indica que el acontecimiento crítico en la fotoinducción es una oxidación catalizada por luz y parece que uno de los primeros enzimas en la síntesis de carotenos es fotoinducido. Se ha sugerido que los carotenoides protegen a estas micobacterias de daño oxidativo que implican singlete de oxígeno (Sección 6.13).

La virulencia de los cultivos de *Mycobacterium tuberculosis* se ha correlacionado con la formación de estructuras en forma de cuerda en agar o medio líquido, debido a la agregación lateral de bacilos encadenados (Figura 12.70*b*). Este crecimiento es debido a la presencia en la superficie celular de un glicolípido o **factor cuerda** (Figura 12.71). La patogénesis de la tuberculosis se discute en detalle en la Sección 26.5.

✓ 12.22-12.23 Revisión de conceptos

Las bacterias Gram positivas de alto contenido en GC incluyen organismos como *Corynebacterium, Propionibacterium* y *Mycobacterium*. Fundamentalmente, son habitantes saprofitos del suelo pero *Mycobacterium tuberculosis* es el agente etiológico de la tuberculosis. *M. tuberculosis* tiene una superficie lipídica y requiere de procedimientos especiales de tinción (tinción AAR) para observar las células al microscopio.

- ✓ ¿Qué es división por fractura y qué microorganismo la practica?
- ✓ ¿Qué microorganismo está implicado en la maduración del queso suizo y qué compuestos químicos son los responsables del sabor?
- ✓ ¿Qué es el ácido micólico, qué microorganismo lo produce y qué propiedades confiere esta sustancia a las células que lo sintetizan?

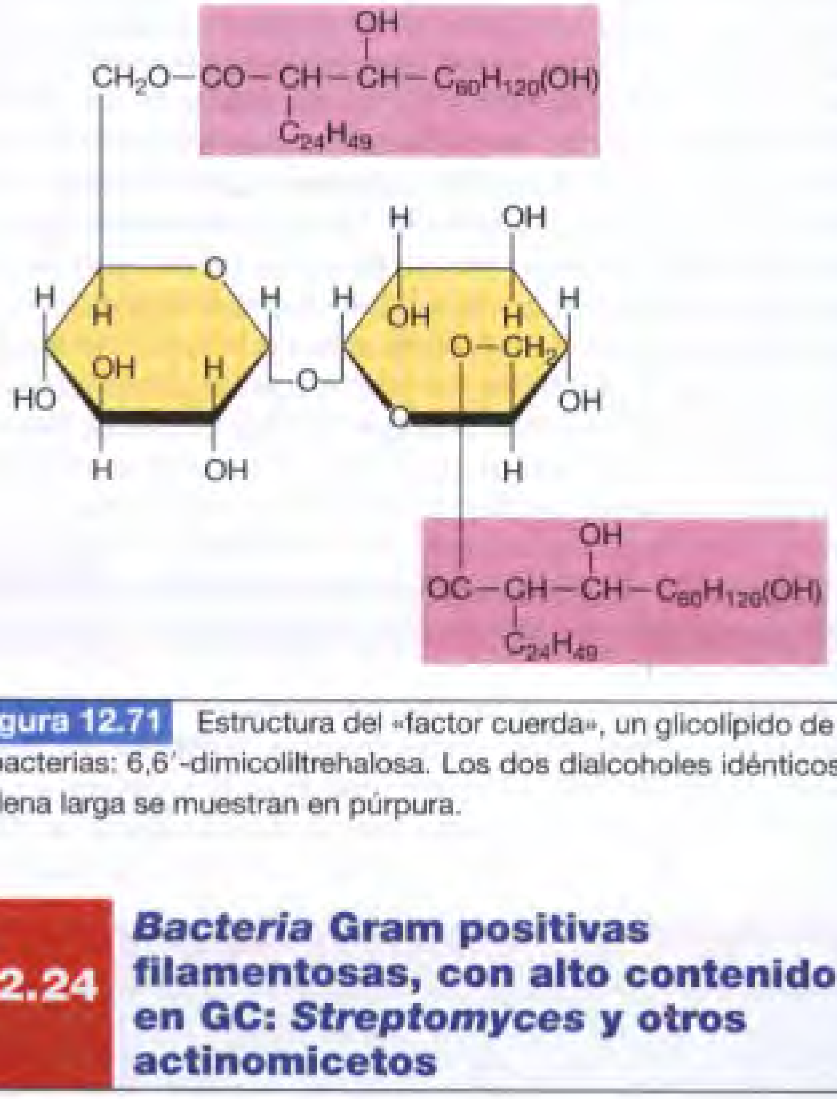


Figura 12.71 Estructura del «factor cuerda», un glicolípido de micobacterias: 6,6′-dimicoliltrehalosa. Los dos dialcoholes idénticos de cadena larga se muestran en púrpura.

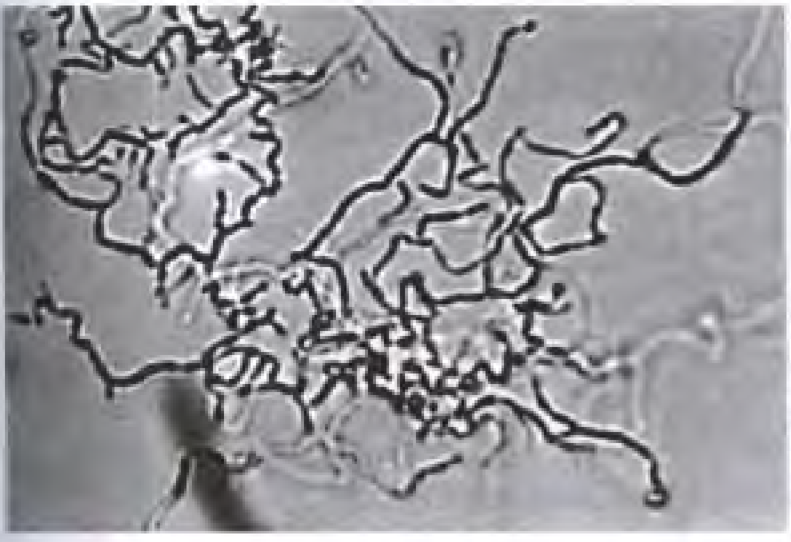
12.24

Bacteria Gram positivas filamentosas, con alto contenido en GC: *Streptomyces* y otros actinomicetos

Géneros clave

Streptomyces
Actinomyces

Los actinomicetos son un grupo de microorganismos filamentosos, dando como resultado un crecimiento en forma de red llamado *micelio* (Figura 12.72). Aunque las dimensiones son mucho más reducidas que el micelio de los hongos (Figura 14.19), son en muchos sentidos comparables. La mayoría de los actinomicetos forman esporas y la forma



Hubert y Mary P. Lechevalier

Figura 12.72 Una colonia reciente de un actinomiceto del género *Nocardia*, mostrando crecimiento filamentoso (micelio). Cada filamento tiene un diámetro de 0,8-1 µm.

en que éstas se forman y se agrupan se usa en la separación de los subgrupos, como se indica en la Tabla 12.30. La composición del DNA cae en el rango de 63-78% GC y los organismos en el extremo alto son las bacterias conocidas que más alto índice GC poseen. Filogenéticamente los actinomicetos forman un grupo coherente; por tanto la característica de miceliar y esporular no sólo es de significado taxonómico sino también evolutivo. En la presente sección se tratará solamente el género *Streptomyces*.

TABLA 12.30 Actinomicetos y géneros relacionados (todos Gram positivos)[a]

Grupo	DNA (GC mol %)
Grupo corineforme; bacilos a menudo en forma de porra, morfológicamente variables, no AAR; división por fragmentación	
Corynebacterium: tinción irregular a menudo con gránulos; forma de porra; saprofitos, patógenos de animales o de plantas	51-65
Arthrobacter: morfogénesis compleja con estadios cocoides o bacilares	59-70
Cellulomonas: morfología que recuerda a corinebacterias; digieren muy activamente la celulosa; anaerobios facultativos	71-73
Kurthia: bacilos con extremos redondeados, normalmente en cadenas; cocoides cuando viejos	36-38
Brevibacterium: morfogénesis que recuerda a las artrobacterias; queso y piel	60-67
Bacterias del ácido propiónico: de anaerobios a aerotolerantes; bacilos o filamentos, ramificados	
Propionibacterium: inmóvil, anaerobio o aerotolerante; produce ácidos propiónico y acético; derivados lecheros (queso suizo); piel; puede ser patógeno	53-68
Eubacterium: anaerobios estrictos; produce mezcla de ácidos orgánicos incluyendo butírico, acético, fórmico y láctico; intestino, infecciones de tejidos blandos; probablemente el microorganismo dominante de la flora intestinal	26-48
Anaerobios estrictos	
Bifidobacterium: microcolonias lisas, sin filamentos; células corineformes frecuentes; tracto intestinal de lactantes	55-67
Acetobacterium: homoacetógeno; sedimentos y alcantarillado	39-43
Butyrivibrio: bacilos curvos; rumen	36-42
Thermoanaerobacter: bacilos termofílicos que se encuentran en manantiales calientes	37-39
Actinomycetes: filamentosos, frecuentemente ramificados; muy diversos	
Grupo I. Actinomycetes: no AAR; aerobios facultativos; sin micelio; bacilos, cocoides o células corineformes	
Actinomyces: anaerobio a aerobio facultativo; microcolonias filamentosas; filamentos dan cocos transitoriamente; pueden ser patógenos para hombres y animales; en cavidad oral	57-69
Otros géneros: *Arachnia, Bacterionema, Rothia, Agromyces*	
Grupo II. Mycobacteria: AAR; filamentos transitorios	
Mycobacterium: patógenos, saprofitos; aerobios estrictos; contenido lipídico celular muy alto; ceras, ácido micólico; nutrición simple crecimiento lento; tuberculosis, ~~lepra;~~ granulomas, tuberculosis aviar; también en el suelo	62-70
Group III. Actinomicetos fijadores de nitrógeno simbiontes de plantas; produce verdadero micelio	
Frankia: forma nódulos de dos tipos en raíces de varias plantas; probablemente microaerofílico; crecimiento lento; fija nitrógeno	67-72
Grupo IV. Actinoplanes; se produce verdadero micelio; esporulado con esporas dentro de esporangios *Actinoplanes, Streptosporangium*	69-71
Group V. Grupo Dermatophilus: los filamentos miceliares se dividen transversalmente en dos planos para formar masas de elementos cocoides; sin micelio aéreo; ocasionalmente responsable de infecciones epidérmicas	
Dermatophilus, Geodermatophilus	56-75
Grupo VI. Las Nocardias: Los filamentos miceliares se fragmentan para dar elementos bacilares y cocoides; esporas aéreas; a veces AAR; contenido lipídico de pared celular muy alto	
Nocardia: microorganismo indígena del suelo; aerobio estricto; utiliza hidrocarbonos	61-72
Rhodococcus: saprofita del suelo; común en intestino de insectos	59-69
Grupo VII. Estreptomicetos: el micelio permanece intacto; abundante micelio aéreo y cadenas largas de esporas	
Streptomyces: casi 500 especies; muchas productoras de antibióticos	69-75
Otros géneros (diferenciados morfológicamente): *Streptoverticillum, Sporichthya, Microellobosporia, Kitasatoa, Chainia*	67-73
Grupo VIII. Grupo de las Micromonosporas; micelio intacto; esporas únicas, pares o cadenas muy cortas; algunas son termofílicas; saprofitos del suelo; recicladotes de materia vegetal; una especia produce endosporas	
Micromonospora, Microbispora, Thermobispora, Thermoactinomyces, Thermomonospora	54-79

[a] Filogenéticamente todas las especies (excepto para *Acetobacterium, Butyrivibrio,* y *Thermoanaerobacter*) pertenecen a *Bacteria* Gram positivas con alto GC.

Sreptomyces

Streptomyces es un género representado por un gran número de especies y de variedades. Se reconocen más de 500 especies de este género con su GC agrupado en el rango 69-73 mol %. Los filamentos de *Streptomyces* tienen usualmente entre 0,5 y 1,0 μm de diámetro, de longitud indefinida y frecuentemente sin septos. El crecimiento ocurre en el extremo de las hifas y va acompañado de ramificación, por lo que la fase vegetativa está formada por un entramado de hifas enmadejadas que da lugar a la colonia. A medida que ésta envejece, se desarrollan elementos aéreos o *esporóforos* que dan lugar a las esporas (Figura 12.73). Las esporas no están, en modo alguno, relacionadas con las endosporas de *Bacillus* o de *Clostridium*, ya que las esporas de los estreptomicetos se forman simplemente por tabicación de un esporóforo multicromosomal y cada tabicación genera una espora o **conidio** individual. Las diferencias en las formas de los elementos aéreos y de cómo éstos se agregan y las diferentes estructuras portadoras de esporas, color, ornamentación etc. son características fundamentales que se tienen en cuenta para la clasificación de las especies del género *Streptomyces* (Figuras 12.75 y 12.76*a*). La apariencia pulverulenta de la colonia madura y su color y olor hace fácil la identificación del género en placas de agar (Figura 12.76*b*).

Ecología y aislamiento de *Streptomyces*

Aunque se pueden encontrar algunas especies de los estreptomicetos en medios acuáticos, son fundamentalmen-

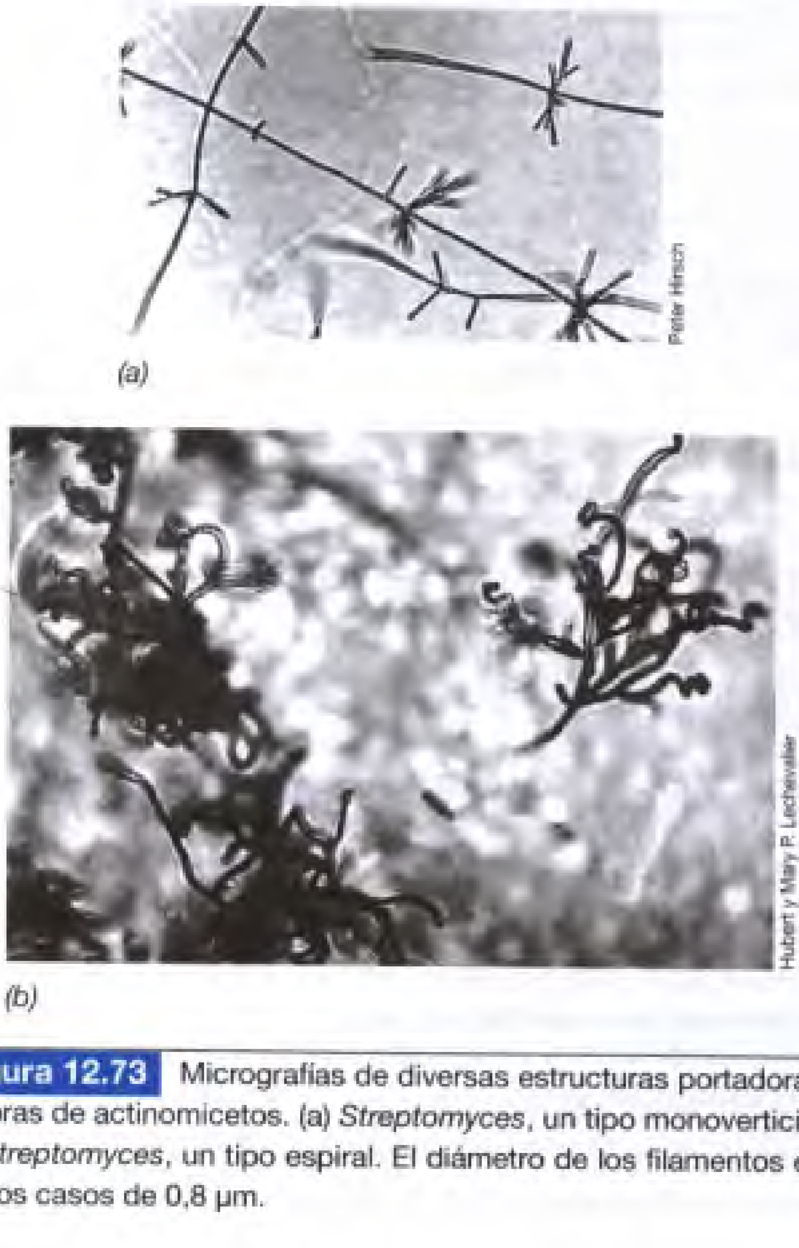

Peter Hirsch
(a)
Hubert y Mary P. Lechevalier
(b)

Figura 12.73 Micrografías de diversas estructuras portadoras de esporas de actinomicetos. (a) *Streptomyces*, un tipo monoverticilado. (b) *Streptomyces*, un tipo espiral. El diámetro de los filamentos es en ambos casos de 0,8 μm.

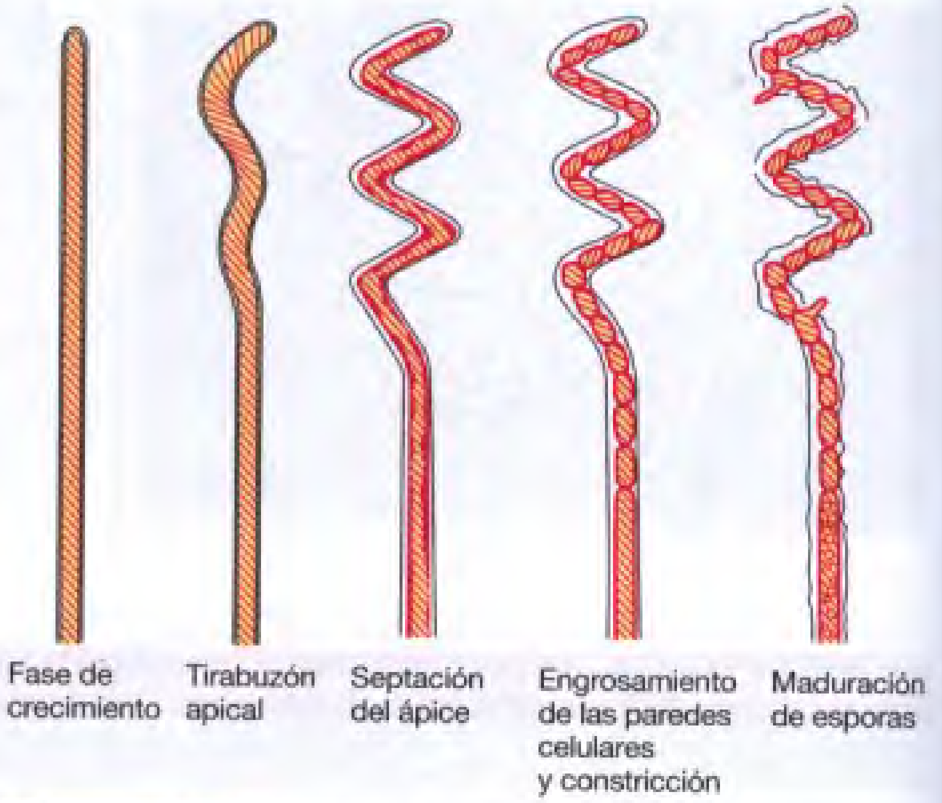

Fase de crecimiento
Tirabuzón apical
Septación del ápice
Engrosamiento de las paredes celulares y constricción
Maduración de esporas

Figura 12.74 Diagrama de los estados en la conversión de una hifa aérea de un estreptomiceto (esporoforos) en esporas (conidios).

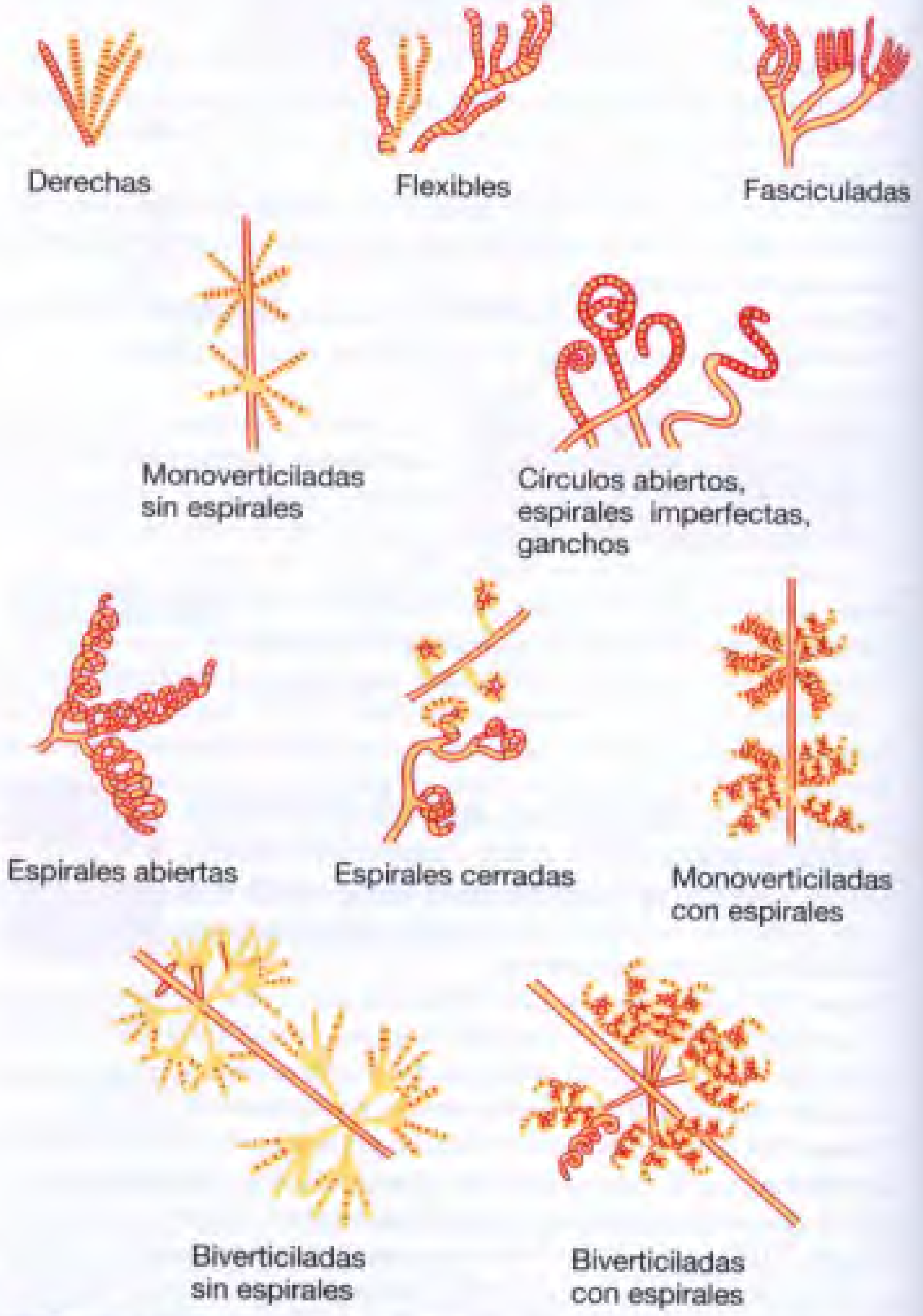

Derechas
Flexibles
Fasciculadas
Monoverticiladas sin espirales
Círculos abiertos, espirales imperfectas, ganchos
Espirales abiertas
Espirales cerradas
Monoverticiladas con espirales
Biverticiladas sin espirales
Biverticiladas con espirales

Figura 12.75 Varios tipos de estructuras portadoras de esporas en los estreptomicetos.

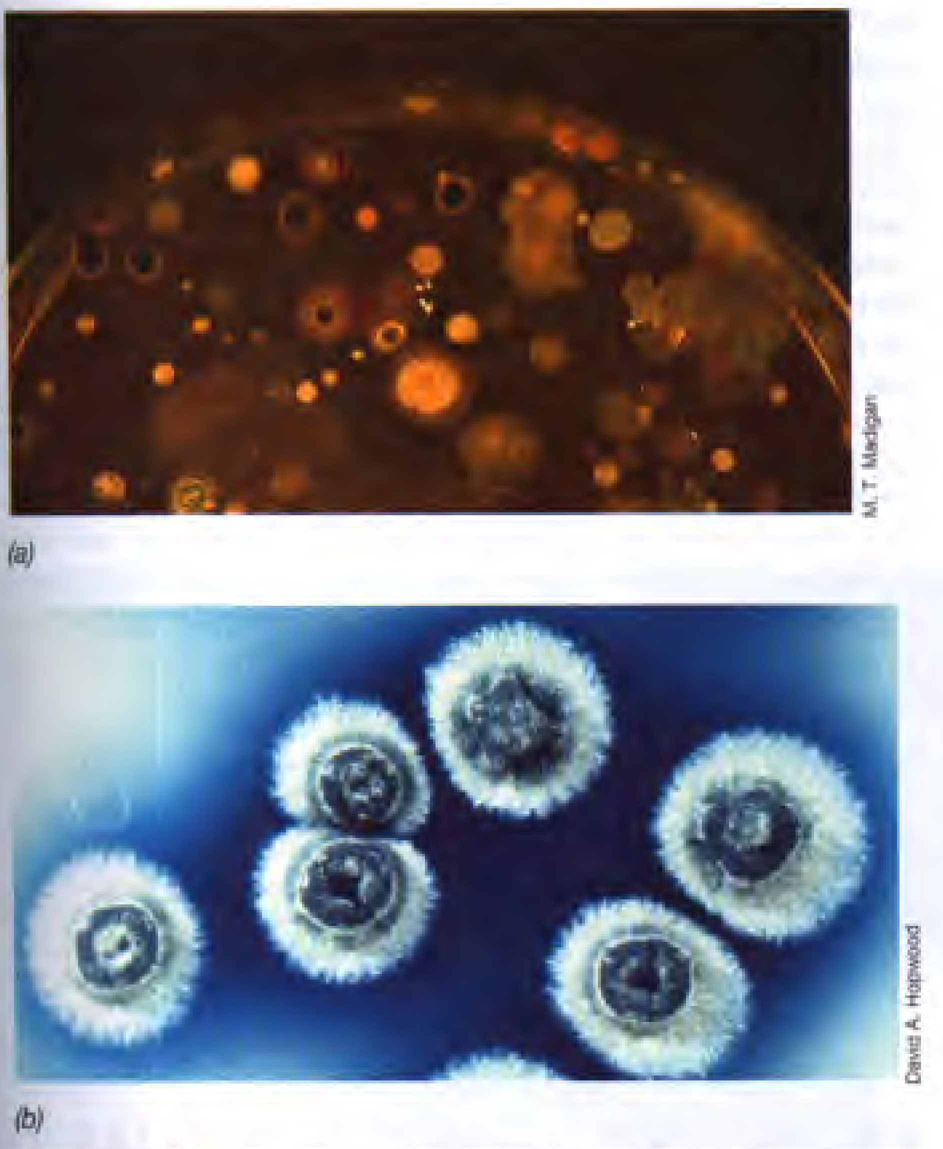


Figura 12.76 *Streptomyces*. (a) Colonias de *Streptomyces* y otras bacterias del suelo procedentes de la inoculación de una dilución de suelo en una placa de agar con caseína y almidón. Las colonias de *Streptomyces* muestran varios colores (algunas colonias negras se ven en el fondo). Estas colonias pueden identificarse fácilmente por ser rugosas, opacas y compactas. (b) Detalle de colonias de *Streptomyces coelicolor*.

te habitantes del suelo. De hecho, el olor característico que tienen a tierra es debido a unos metabolitos especiales denominados *geosminas*. Son sesquiterpenoides, compuestos aromáticos insaturados de carbono, oxígeno e hidrógeno. Uno muy común es el *trans*-1,10-dimetil-*trans*-9-decalol. Algunas cianobacterias también producen geosminas (*véase* Sección 12.26).

Los pHs alcalinos y neutros son más favorables para el desarrollo de los estreptomicetos que los ácidos. Se encuentran en elevado número en suelos bien drenados o suelos cubiertos con fangos. Existen ciertas evidencias de que los estreptomicetos requieren bajo potencial de agua para el crecimiento, más bajo que otro tipo de bacterias. El aislamiento de *Streptomyces* a partir de muestras de suelo es relativamente fácil: se siembra en medio selectivo una suspensión de suelo en agua estéril y se incuba a 25°C (Figura 30.7*a*). Los medios habituales contienen las sales inorgánicas necesarias a las que se puede añadir almidón, asparragina o malato cálcico como fuente de carbono y caseína no digerida o nitrato potásico, como fuente de nitrógeno. Después de una incubación de 5-7 días en aire, se examinan las placas para colonias características de *Streptomyces* (Figuras 12.76 y 12.77) y se pueden utilizar las esporas de colonias interesantes para el aislamiento en cultivo puro. Nutricionalmente son muy versátiles. Es raro el requerimiento de factores de crecimiento y pueden utilizar una gran variedad de compuestos como fuente de carbono tales como azúcares, alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos e incluso algunos compuestos aromáticos. La inmensa mayoría de las especies producen enzimas extracelulares que les permiten utilizar sustratos complejos como el almidón, celulosa o hemicelulosa, lignina, tanino o incluso gomas. A menudo, se pueden aislar los estreptomicetos sembrando directamente una dilución de suelo sobre medio alcalino que contenga polímeros como caseína o al-

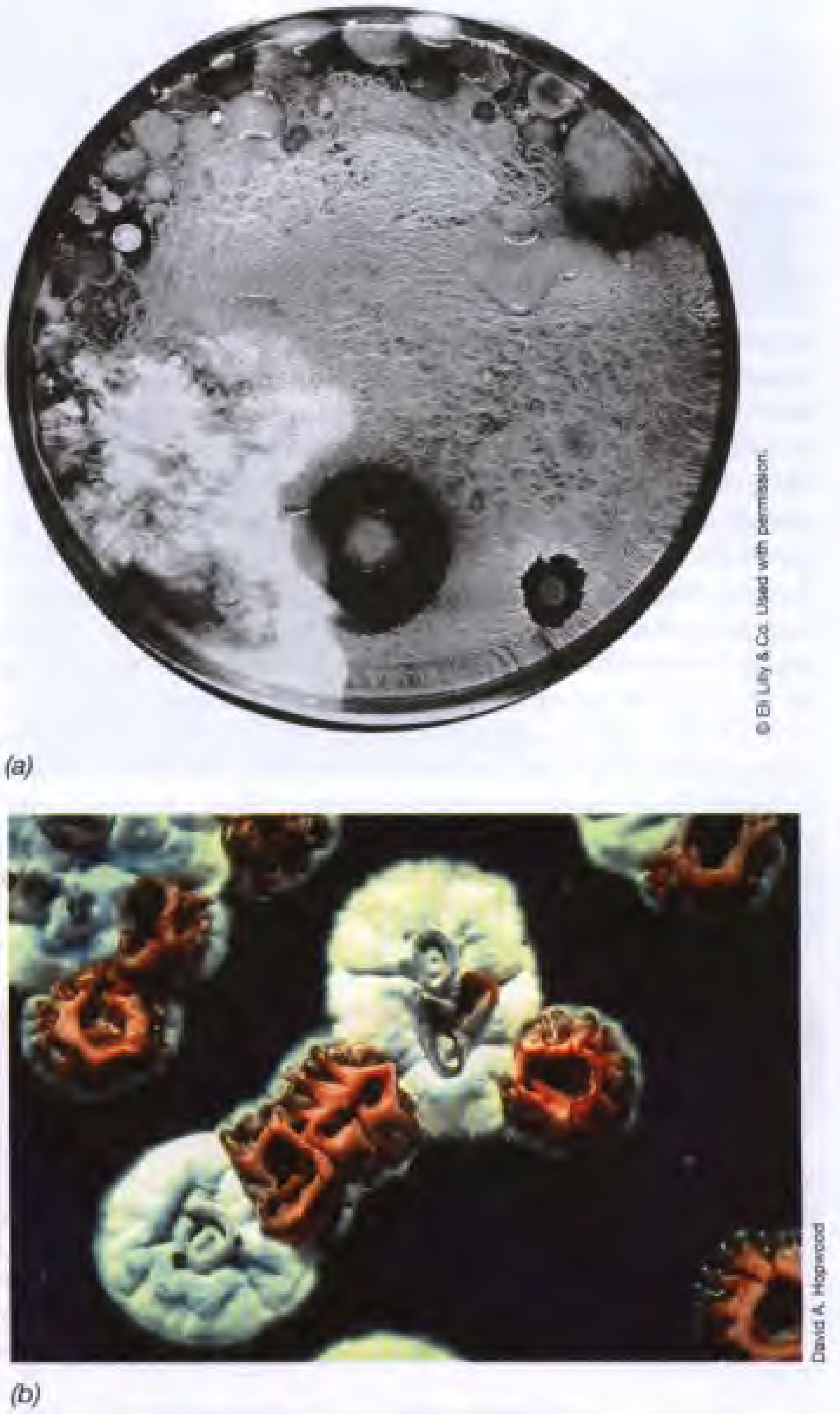


Figura 12.77 Antibióticos de *Streptomyces*. (a) Antibiosis de microorganismos del suelo. Las colonias más pequeñas rodeadas de zonas de inhibición son estreptomicetos; las más grandes son de una especie de *Bacillus*. (b) El antibiótico rojo undecil-prodigiosina está siendo excretado por colonias de *Streptomyces coelicolor*.

midón (Figura 12.76*a*). Un aislado único puede ser capaz de utilizar por encima de 50 fuentes de carbono diferentes. Son aerobios estrictos y el crecimiento se ve favorecido por la utilización de aireación forzada. Normalmente en medio líquido no ocurre la esporulación, pero sí tiene lugar sobre la superficie de un medio sólido.

Los antibióticos de *Streptomyces*

Quizás la propiedad más sorprendente y extendida entre las especies del género *Streptomyces* es su capacidad de producir **antibióticos** (Tabla 12.31). Esta propiedad puede verse incluso en las placas de agar utilizadas para el aislamiento inicial de *Streptomyces*: las colonias adyacentes de otras bacterias muestran zonas de inhibición (Figuras 12.76*a* y 12.77*a*; *véase* Figura 30.7*a*). En algunos estudios, cerca del 50% de los estreptomicetos analizados esta capacidad de producir antibióticos. Debido a la importancia médica e industrial de estos compuestos, quizás sea este el tema en que mayores recursos de investigación han invertido los países. Los estreptomicetos tomados globalmente producen más de 500 sustancias antibióticas diferentes y se sospecha que hay muchas más todavía (Sección 30.6), muchas de ellas ya se han identificado químicamente (Figura 12.77*b*). Algunas de las cepas producen más de un antibiótico que pueden no estar químicamente relacionados. El mismo antibiótico puede estar sintetizado por especies diferentes distribuidas en muy diferentes partes del mundo y aunque el productor de un antibiótico es resistente al antibiótico que produce, es sensible a los producidos por otros estreptomicetos. Mas de 60 antibióticos producidos por este grupo de microorganismos han encontrado utilidad en medicina humana y veterinaria, así como en agricultura e industria. Algunos de los antibióticos más comunes de los estreptomicetos se listan en la Tabla 12.31. Se agrupan en clases según la estructura de su molécula. La búsqueda de nuevos antibióticos de estreptomicetos continúa, ya que muchas enfermedades infecto contagiosas todavía no están controladas adecuadamente por los antibióticos actuales. También, porque el desarrollo de nuevas cepas resistentes obliga a tal búsqueda. Irónicamente y a pesar del enorme esfuerzo investigador en torno a los estreptomicetos como productores de antibióticos y a que la industria del antibiótico es la que más dinero mueve, la ecología de este grupo de microorganismos está muy poco estudiada. El racional ecológico del porqué una cepa produce un antibiótico no está claro. Una hipótesis se basa en que ya que su producción está ligada al proceso de esporulación y éste ocurre en condiciones limitantes de nutrientes, el antibiótico garantizaría la no-proliferación y por tanto competencia de otros microorganismos en un medio ya pobre en nutrientes. Esta ventaja permitiría llevar a cabo el proceso de esporulación y por tanto de aumentar las posibilidades de supervivencia.

✓ 12.24 Revisión de conceptos

Los etreptomicetos constituyen un amplio grupo de microorganismos filamentosos. Gram positivos y esporulados que se forman al final del micelio aéreo. Muchos de los antibióticos de gran impacto clínico como las tetraciclinas y neomicina vienen de especies de *Streptomyces*.

- ✓ ¿En qué difieren las esporas y el proceso de esporulación en *Streptomyces* y en *Bacillus*?
- ✓ ¿Qué clase de organismo, energéticamente hablando, es un *Streptomyces* y a partir de qué tipo de compuestos obtienen estos organismos su energía?
- ✓ ¿Por qué puede significar una ventaja para un estreptomiceto el producir un antibiótico?

IV PHYLUM 3: CIANOBACTERIAS Y PROCLOROFITOS

12.25 Cianobacterias

Géneros Clave

Synechococcus
Oscillatoria
Nostoc

Las cianobacterias comprenden un gran grupo morfológicamente heterogéneo de bacterias fototróficas. Las ciano-

TABLA 12.31 Algunos antibióticos comunes producidos por especies de *Streptomyces*

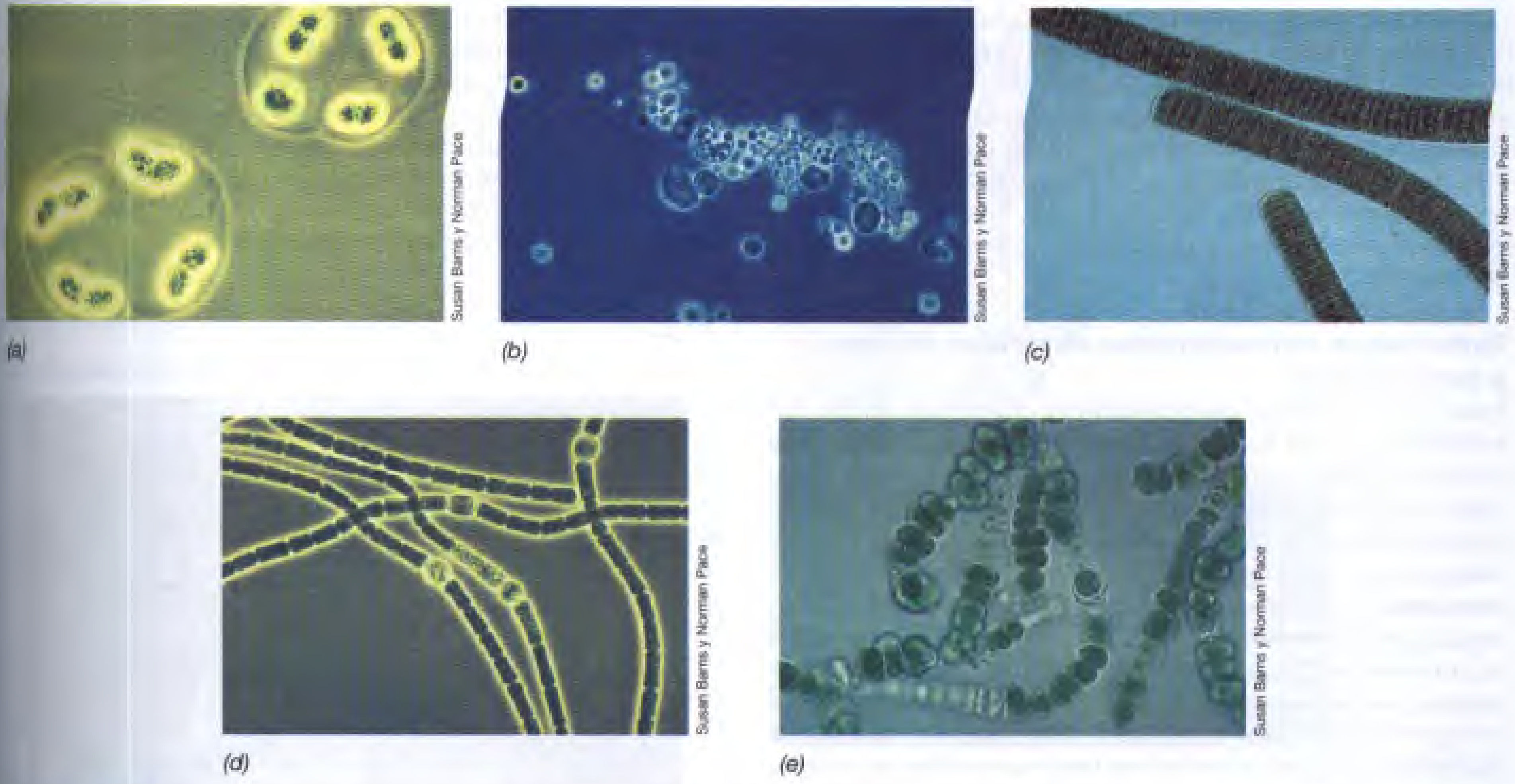
Clase química	Nombre	Producidopor común	Activo frente[a]
Aminoglicósidos	Estreptomicina	*S. griseus*	La mayoría de *Bacteria* Gram negativas
	Espectinomicina	*Streptomyces* spp.	*M. tuberculosis, N. gonorrhoeae* productor de penicilinasa
	Neomicina	*S. fradiae*	Amplio espectro; solo en infecciones tópicas por su toxicidad
Tetraciclinas	Tetraciclinas	*S. aureofaciens*	Amplio espectro frente a Gram positivos y negativos, riquetsias y clamidias, así como *Micoplasma*
	Clorotetraciclina	*S. aureofaciens*	Como las tetraciclinas
Macrólidos	Eritromicina	*S. erythreus*	La mayoría de bacterias Gram positivas, frecuentemente utilizados en lugar de penicilina, *Legionella*
	Clindamicina	*S. lincolnensis*	Efectivo frente a anaerobios estrictos, especialmente *Bacteroides fragilis*
Polienos	Nistatina	*S. noursei*	Hongos, especialmente infecciones por *Candida*
	Anfotericina B	*S. nodosus*	Hongos
Ninguna	Cloranfenicol	*S. venezuelae*	Amplio espectro; droga de elección para las fiebres tifoideas

[a] La mayor parte de los antibióticos son efectivos frente a diferentes *bacteria*. Las entradas en esta columna se refieren a aplicaciones en clínica de un antibiótico determinado. Las estructuras y modo de acción de muchos antibióticos se recogen en las Secciones 20.7-20.9.

bacterias difieren en características clave de las bacterias rojas y verdes anoxifototróficas; concretamente las cianobacterias son, a todos los efectos, organismos fotosintéticos oxigénicos. Representan uno de los reinos de *Bacteria* y tienen una relación lejana con las bacterias Gram positivas (*véase* Figura 12.1). El significado evolutivo de las cianobacterias se discutió en la Sección 11.1 y es bastante probable que estos microorganismos fueron los primeros seres que, siendo aerobios, contribuyeron, gracias a la fotosíntesis oxigénica, a la formación del oxigeno en la Tierra y por tanto responsables del cambio atmosférico de anóxico a contener oxígeno.

Estructura y clasificación de las Cianobacterias

La diversidad morfológica de las cianobacterias es impresionante (Figura 12.78). Se conocen tanto formas unicelulares como filamentosas. Se pueden dividir en cinco grupos morfológicos: unicelulares que se dividen por fisión binaria (*véase* Figura 12.78*a*); unicelulares que se dividen por fisión múltiple (colonial) (*véase* Figura 12.78*b*); filamentosas con células especiales fijadoras de nitrógeno o heterocistos (*véase* Figura 12.78d 12.80); filamentosas pero sin heterocistos (*véase* Figura 12.78*c*); y filamentosas ramificadas (*véase* Figura 12.78*e*). La Tabla 12.32 recoge los principales géneros de cada grupo. Las células de cia-



Susan Barns y Norman Pace

Figura 12.78 Diversidad morfológica entre las cianobacterias: los 5 tipos principales morfológicos de cianobacterias. (a) Unicelular, *Gloeotheca*, contraste de fases y diámetro 5-6 µm. (b) Colonial, *Dermocarpa*, contraste de fases. (c) Filamentosa, *Oscillatoria*, campo claro, diámetro celular de 15 µm. (d) Heterocisto filamentoso, *Anabaena*, contraste de fases, anchura celular de 5 µm. (e) filamentosa ramificada, *Fischerella*, campo claro.

TABLA 12.32 Géneros y agrupamiento de las Cianobacterias

Grupo	Géneros	DNA (GC mol %)
Grupo I. Unicelulares: células aisladas o agregados celulares	*Gloeothece* (Figura 12.78a), *Gloeobacter, Synechococcus Cyanothece, Gloeocpasa,Synechocystis, Chamaesiphon, Merismopedia*	35-71
Grupo II. Pleurocapsaleano: se reproducen por formación de pequeñas células esféricas llamadas baeocitos producidos por fisión múltiple	*Dermocarpa* (Figura 12.78b), *Xenococcus, Dermocarpella Pleurocapsa, Myxosarcina, Chroococcidiopsis*	40-46
Grupo III. Oscilatoriano: filamentos que se dividen por fisión binaria en un plano único	*Oscillatoria* (Figura 12.78c), *Spirulina, Arthrospira, Lyngbya, Microcoleus, Pseudanabaena*	40-67
Grupo IV. Nostocaleano: células filamentosas que producen heterocistos	*Anabaena* (Figura 12.78d), *Nostoc, Calothrix, Nodularia Cylinodrosperum, Scytonema*	38-46
Grupo V. Ramificaciones: células que forman ramificaciones	*Fischerella* (Figura 12.78e), *Stigonema, Chlorogloeopsis Hapalosiphon*	42-46

nobacterias tienen un tamaño que va desde el típico de una bacteria (0,5-1 μm de diámetro) hasta células de hasta 60 μm de diámetro (en la especie *Oscillatoria princeps*, Figura 4.44*a*).

La estructura de la pared celular de algunas cianobacterias es semejante a la de bacterias Gram negativas y presentan peptidoglucano en la misma (Figura 12.79). Muchas cianobacterias producen envueltas mucilaginosas, vainas etc. que reúnen a muchas células y filamentos todos juntos (*véase* por ejemplo la Figura 12.78*a*). Las membranas lamelares fotosintéticas son a menudo complicadas y forman multicapas (Figura 17.10*b*), aunque en formas simples de cianobacterias, las lamelas están organizadas en formas concéntricas en la periferia del citoplasma (Figura 12.79). Las cianobacterias tienen una sola forma de clorofila, la clorofila *a* y todas ellas tienen pigmentos biliproteicos **(ficobilinas)** (Figura 17.10*a*) que funcionan como pigmentos accesorios de la fotosíntesis. Una clase de ficobilinas, las ficocianinas, es azul y junto con el verde de la clorofila es el responsable del color azul verdoso de estos microorganismos. Sin embargo, algunas cianobacterias producen *ficoeritrina*, una ficobilina roja y estas especies son rojizas.

Variaciones estructurales: vesículas de gas y heterocistos

Entre las estructuras citoplasmáticas que se ven en las cianobacterias están las **vesículas de gas** (Sección 4.14), que son muy comunes en las especies que viven en aguas libres (especies planctónicas), su función es regular el índice de flotabilidad celular para ubicarse en la zona óptima de iluminación para la fotosíntesis. Algunas especies forman **heterocistos**, que son redondos y aparentemente vacíos, usualmente distribuidos regularmente en los filamentos o en un extremo (Figura 12.80*a*). Se originan por diferenciación de una célula vegetativa y en ellos ocurre la *fijación del nitrógeno* (reducción de N_2 hasta NH_3, Sección 17.28). En *Anabaena*, una cianobacteria con heterocisto bien estudiada, ocurre un ordenamiento génico de primera magnitud para originar un grupo de genes *nif* que se expresan como una unidad (Sección 17.28). Los heterocistos tienen conexiones intercelulares con células adyacentes y existe intercambio mutuo de materiales entre ellas, con productos derivados de la fotosíntesis que se dirigen a los heterocistos y productos derivados de la fijación de nitrógeno que se dirigen hacia las células vegetativas (Figura 12.80*b*). Los heterocistos tienen poca ficobiliproteína y *carecen* del fotosistema II. El fotosistema que produce oxígeno y genera poder reductor a partir de H_2O (*véase* Sección 17.25). Sin él son incapaces de fijar el CO_2 y por tanto carecen de donador de electrones necesario para la reducción del nitrógeno molecular; el carbono fijado en células adyacentes, que es importado por los heterocistos por las comunicaciones especiales, resuelve este problema (Figura 12.80*b*).

Los heterocistos están rodeados por una gruesa pared celular que contiene grandes cantidades de glicolípidos, que sirve para retardar la difusión de oxígeno a la célula, debido a la sensibilidad de la nitrogenasa al oxígeno (Sección 17.29). Parece plausible que el heterocisto, manteniendo unas condiciones anóxicas, estabiliza el aparato fijador de nitrógeno en unos organismos que no solamente son aerobios, sino que además generan oxígeno en la fotosíntesis. De hecho, algunas cianobacterias filamentosas

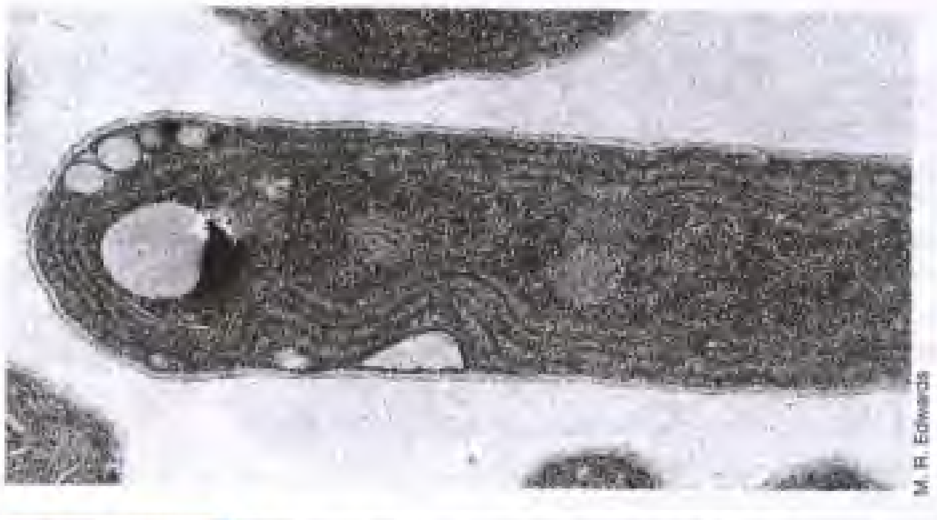


Figura 12.79 Micrografía electrónica (corte fino) de la cianobacteria *Synechococcus* lividus. Una célula tiene un diámetro de 5 μm. Nótense los tilacoides dispuestos paralelamente a la pared celular.

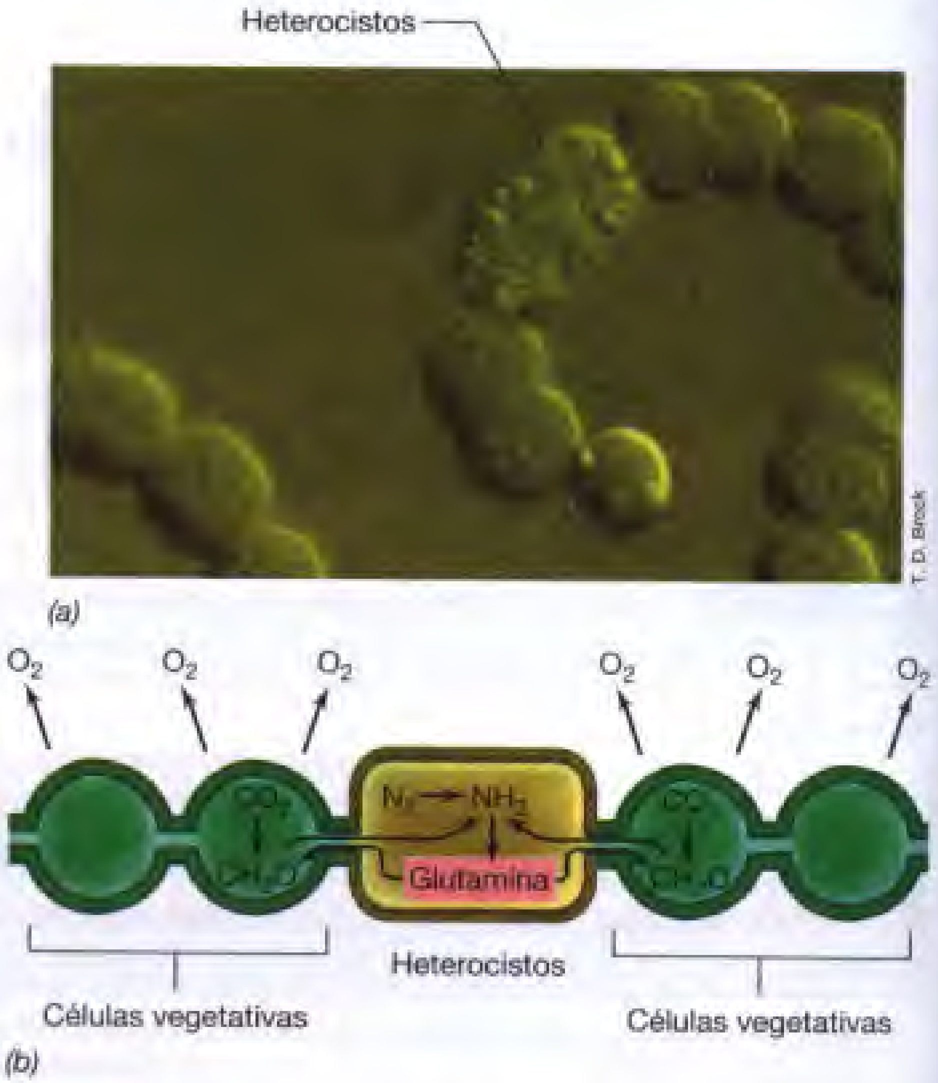


Figura 12.80 Heterocistos. (a) Heterocistos de la cianobacteria *Anabaena*. Los heterocistos sirven para la fijación de nitrógeno en las cianobacterias. (b) Modelo de función de los heterocistos. El heterocisto carece de la capacidad de producir oxígeno (Fotosistema II, Sección 17.5) y obtiene el poder reductor necesario para la fijación del nitrógeno de la materia orgánica producida por las células vegetativas adyacentes. La glutamina es la forma en que se transporta el nitrógeno fijado de los heterocistos a las células vegetativas.

sin heterocistos producen nitrogenasa y fijan nitrógeno en células vegetativas si se las crece anaeróbicamente burbujeando vigorosamente nitrógeno para eliminar el oxígeno disuelto.

Cianoficina y otras estructuras

La microscopia electrónica revela la presencia de **cianoficina** en muchas cianobacterias. Es un copolímero de ácido aspártico y arginina:

$$\begin{array}{ccccccccccc} \text{Asp} & - & \text{Asp} & - & \text{Asp} & - & \text{Asp} & - & \text{Asp} & - \\ | & & | & & | & & | & & | & \\ \text{Arg} & & \text{Arg} & & \text{Arg} & & \text{Arg} & & \text{Arg} & \end{array}$$

Y puede constituir hasta el 10% de la masa celular. La cianoficina es una reserva de nitrógeno en muchas cianobacterias y cuando escasea el nitrógeno en el medio ambiente, el polímero es degradado y utilizado. La cianoficina es también una reserva energética. La arginina derivada de ella es hidrolizada para dar ornitina con producción neta de ATP a través del enzima *arginina dihidrolasa* siendo el carbamil fosfato un intermediario (Sección 17.19):

$$\text{Arginina} + \text{ADP} + \text{P}_i + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ornitina} + 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2 + \text{ATP}$$

La arginina dihidrolasa está presente en muchas cianobacterias y puede funcionar como una fuente de ATP durante periodos de oscuridad.

Muchas cianobacterias presentan movilidad deslizante; nunca se han descrito verdaderos flagelos. El deslizamiento ocurre cuando las cianobacterias se encuentran sobre sustratos sólidos, con otras células o con filamentos. En algunas cianobacterias este tipo de movimiento no es simplemente un movimiento translacional sino que va acompañado con rotaciones y flexiones de los filamentos. La mayoría de las especies tienen movimiento direccional hacia la luz (fototaxis) y quimiotaxis (Sección 4.12).

Entre las cianobacterias filamentosas es frecuente la fragmentación para generar los **hormogonios** (Figura 12.81*a* y *b*) que se deslizan independientemente del filamento inicial. En algunas especies se forman esporas de resistencia o **acinetos** (Figura 12.81*c*) que protegen al organismo durante periodos de oscuridad, sequedad o congelación. Se trata de células con paredes celulares más gruesas y que germinan por ruptura de la pared externa y regeneración de un nuevo filamento. Sin embargo, incluso las células vegetativas de muchas cianobacterias son relativamente resistentes a la sequedad y bajas temperaturas.

Fisiología de las cianobacterias

La nutrición de las cianobacterias es muy simple. No requieren vitaminas y utilizan nitrato o amoníaco como fuente de nitrógeno. La fijación de nitrógeno es una característica frecuente. La mayoría de las especies son fototrofas obligadas, aunque algunas estirpes asimilan compuestos orgánicos tales como glucosa y acetato siempre y cuando la luz esté presente (fotoasimilación). Algunas cianobacterias, principalmente las especies filamentosas, pueden crecer en la oscuridad con glucosa u otros azúcares, utilizando el material orgánico como fuente de carbono y energía.

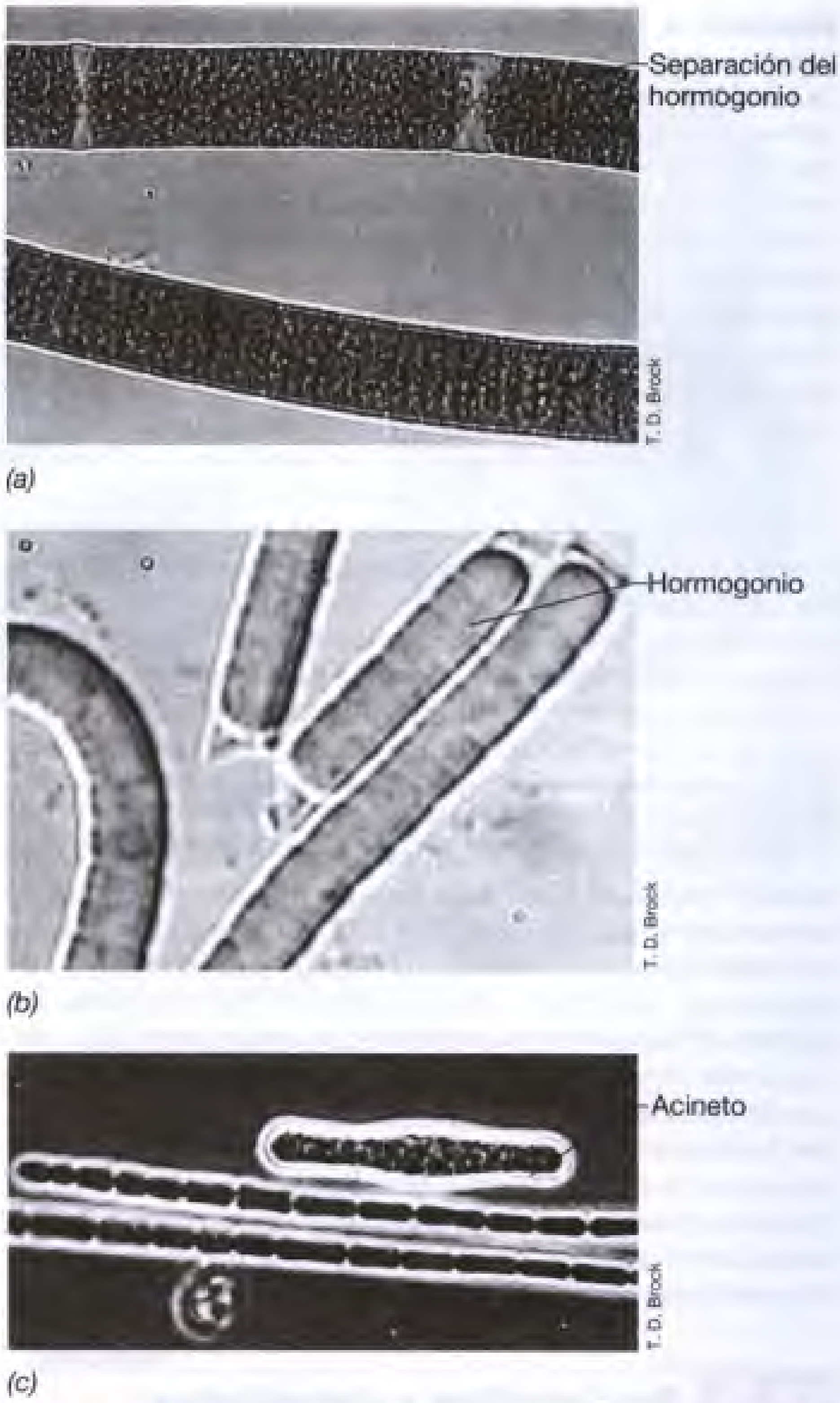


Figura 12.81 Diferenciación estructural en cianobacterias filamentosas. (a) Estados iniciales de formación de hormogonios en *Oscillatoria*. Nótese el espacio vacío donde el hormogonio se está separando del filamento. (b) Hormogonio de una especie más pequeña de *Oscillatoria*. Nótese que las células en ambos extremos son redondeadas. Microscopía de contraste por interferencia Nomarski. (c) Acineto (espora) de *Anabaena* (contraste de fases).

Hay diversos productos metabólicos de las cianobacterias que tienen una importancia práctica considerable. Muchas, producen potentes neurotoxinas que pueden llegar a matar a animales que beban de agua contaminada. Muchas cianobacterias son las responsables del olor y sabor a tierra en el agua debido a la producción de *geosmina* (*trans*-1,10-dimetil-*trans*-9-decalol). Esta misma sustancia es producida por muchos actinomicetos (*véase* Sección 12.24) que es la responsable del distintivo olor a suelo húmedo recién removido.

Ecología y filogenia de las cianobacterias

Las cianobacterias están ampliamente distribuidas en la naturaleza en medios terrestres o acuáticos (tanto agua dulce como salada). En general son más resistentes a medios extremos que las algas y muy a menudo en géiseres o manantiales de agua caliente son los únicos microorganismos representantes de fotosíntesis oxigénica (Tabla 6.1). Muchos miembros de este grupo se localizan sobre la superficie de las rocas e incluso dentro de ellas (Figura 14.29). En suelos desérticos que están sujetos a luz solar intensa, las cianobacterias forman una costra sobre el suelo, permaneciendo en estado durmiente la mayor parte del año, creciendo solamente durante el corto invierno y primavera. En medios marinos poco profundos con agua templada se forman capas considerables de cianobacterias. De igual manera, en lagos de agua dulce, especialmente aquellos ricos en nutrientes, pueden desarrollar autenticas explosiones de crecimiento cianobacterial (Figura 19.10*b*). Algunas pocas son simbiontes de helechos o cicadíneas y un buen número son simbiontes de los líquenes. En el caso de la pteridofita acuática *Azolla* (Secciones 17.28 y 19.22) se ha descrito un endofito del género *Anabaena* que fija nitrógeno que utiliza la planta.

Se ha determinado la composición en GC del DNA de muchas cianobacterias. Aquellas que son unicelulares presentan un índice GC entre 35 y 71%; un rango tan amplio que inmediatamente nos sugiere que el grupo incluye elementos con muy poca relación entre sí. Por otra parte, los valores de las que forman heterocistos varían mucho menos, entre 38 y 46% GC. Filogenéticamente las cianobacterias se agrupan en linajes morfológicos. Los filamentosos con heterocistos y sin heterocistos forman grupos distintos, como ocurre con las formas ramificadas. Sin embargo, las cianobacterias unicelulares son filogenéticamente muy diversas con diferentes representantes que tienen relaciones filogenéticas con diferentes grupos morfológicos.

12.26 Proclorofitos y cloroplastos

Géneros clave

Prochlorococcus
Prochloron
Prochlorothrix

Los proclorofitos son fototrofos oxigénicos que contienen clorofila a y b pero que no contienen ficobilinas. Los proclorofitos por tanto se asemejan a las cianobacterias (ya que son procariotas y producen clorofila a) y a los cloroplastos de las plantas (porque poseen clorofila b en lugar de ficobilinas). Filogenéticamente, sin embargo, los proclorofitos muestran claros signos de relación con las cianobacterias, lo que demuestra que compartieron un antecesor común.

Prochloron

Prochloron fue el primer proclorofita descubierto. En la naturaleza se encuentra simbionte de invertebrados marinos (ascidias) y no han sido cultivadas en el laboratorio (todos los estudios de este organismo derivan de material recogido de muestras naturales). Son células esféricas (Figura 12.82) con diámetro de 8-10 μm. La microscopía electrónica (Figura 14.6) revela que *Prochloron* tiene tilacoides que recuerdan a los de los cloroplastos. Otra prueba de que *Prochloron* filogenéticamente, es un miembro de *Bacteria* es la presencia de ácido murámico en su pared, lo que indica que tiene peptidoglicano (Sección 4.8). Los carotenos predominantes son el β caroteno y la zeaxantina. Probablemente existen diversas especies de este género, pero este extremo no se puede confirmar hasta que se puedan cultivar en cultivo puro.

Prochlorothrix y *Prochlorococcus*

Prochlorothrix es un proclorofito filamentoso (Figura 12.83) que puede crecer en cultivo puro. Como en el caso de *Prochloron*, *Prochlorothrix* contiene clorofila a y b y carece de ficobilinas, aunque los tilacoides están menos desarrollados que en *Prochloron* (comparar las Figuras 12.82 y 12.83*b*).

Un proclorofito más reciente, *Prochlorococcus*, habita la zona eufótica de los océanos. Las células de estos fototrofos son cocos pequeños, miden menos de 1 μm de diámetro (Figura 19.11*a*). Contiene clorofila b y carece de clorofila a; en su lugar produce una forma modificada: *clorofila a divinílica*. Como forma carotenoídica produce α caroteno en lugar de β caroteno, siendo la primera vez que se describe en el mundo procariótico. Debido a que su número en océanos es relativamente alto (10^4-10^5 células/ml), estos proclorofitos probablemente representan formas importantes de productores primarios. Se han aislado otras formas relacionadas con ellos incluyendo *Acaryochloria* (Figura 12.83*c*) que contiene clorofila d como pigmento más importante que precisamente se encuentra en bastantes algas eucarióticas (Sección 14.12).

Proclorofitos, cloroplastos y evolución

Basándonos en los planteamientos sobre endosimbiosis expuestos en la presente obra (Secciones 2.6, 11.3 y 14.5), el significado evolutivo de los proclorofitos debería ser aparente. Hasta el descubrimiento de los proclorofitos, se asumía que

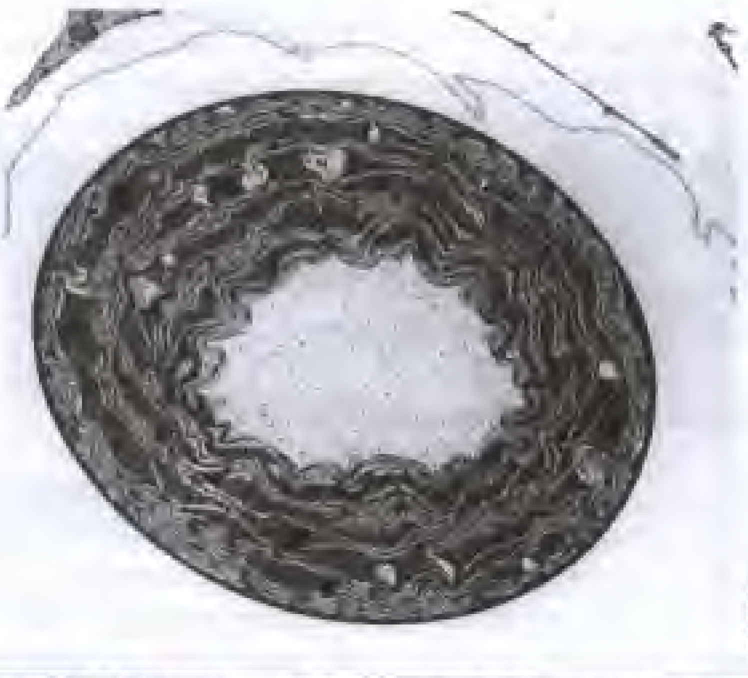
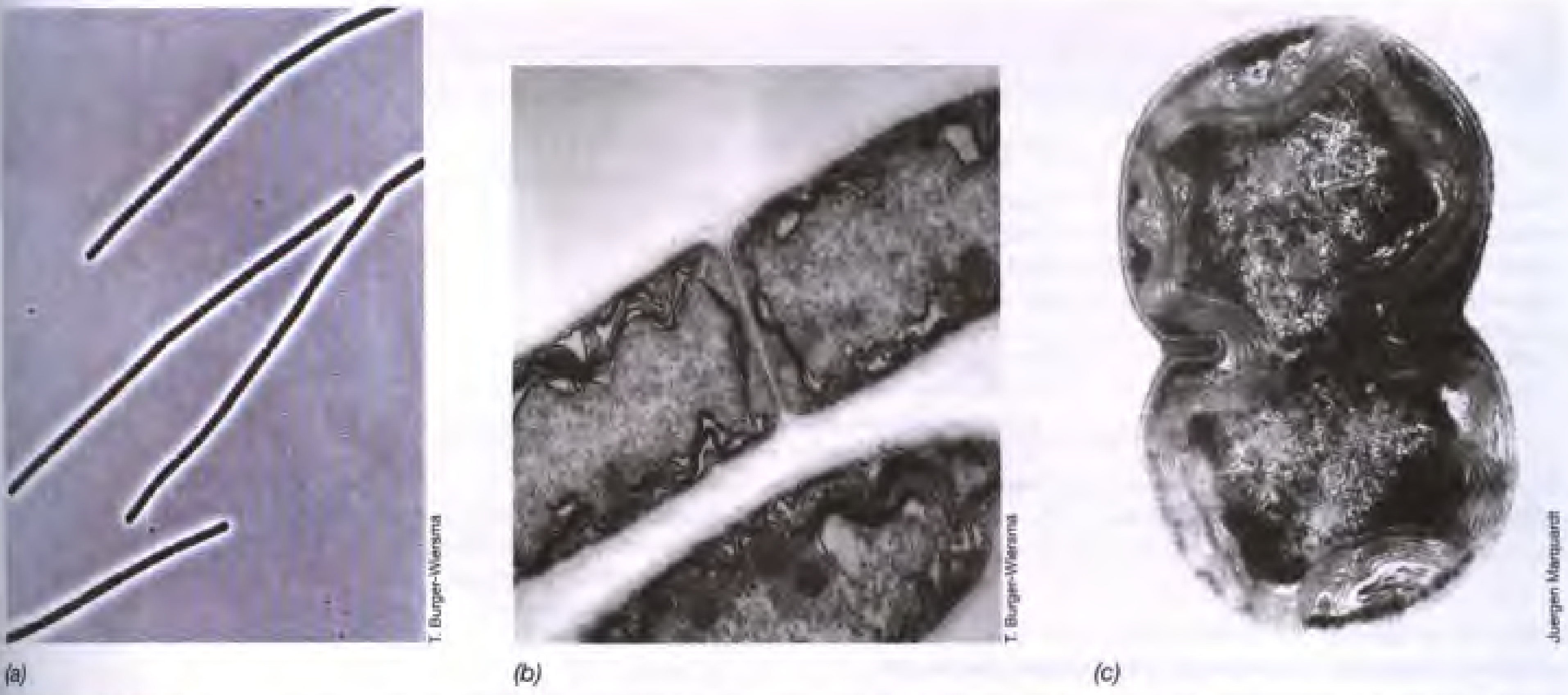

Kit W. Lee

Figura 12.82 Micrografía electrónica del proclorofito *Prochloron*. Nótese el gran desarrollo membranal intracitoplasmático (tilacoides). Diámetro de 10 μm.



T. Burger-Wiersma

T. Burger-Wiersma

Juergen Marquardt

Figura 12.83 Micrografía de contraste de fases y electrónica del proclorofito filamentoso *Prochlorothrix*. (a) Contraste de fases. (b) Micrografía electrónica (corte fino) mostrando la organización de las membranas internas. Diámetro celular de 2 μm. (c) *Acaryochloris*. Este proclorofito contiene clorofila *d* como principal pigmento. Diámetro celular de 1,5 μm.

el cloroplasto se originó por asociación endosimbiótica de una *cianobacteria* con una célula encariótica primitiva. Sin embargo esta hipótesis nunca satisfizo al mundo científico: ¿cómo el cloroplasto de las plantas verdes produjo el pigmento que tiene actualmente si se originó de una *cianobacteria* endosimbiótica que contenía *ficobilinas* en lugar de clorofila II*b*? La hipótesis de que un *proclorofito* en lugar de una cianobacteria, era el antecesor de los cloroplastos de plantas era mucho más atractiva. Sin embargo un análisis filogenético exhaustivo no demuestra que los *Prochloron*, *Prochlorococcus*, y *Prochlorothrix* sean los antecesores directos de los cloroplastos de las plantas verdes; en su lugar, parece ser que existió un ancestro común del que salen las ramas evolutivas para proclorofitos, cianobacterias y cloroplastos.

Por tanto una hipótesis a tener en cuenta es la que contempla un ancestro común para cianobacterias y proclorofitos que contendría ficobilinas y clorofilas ademas de la clorofila *a*, clorofilas *b* o *d*; a partir de él, el linaje cianobacteriano evolucionó perdiendo las clorofilas accesorias mientras que el linaje proclorofita lo hizo perdiendo las ficobilinas. Los pigmentos complementarios que actualmente encontramos en ambos grupos representan la mejor combinación para poder subsistir en sus hábitat particulares.

✓ 12.25-12.26 Revisión de conceptos

Las cianobacterias y los proclorofitos son procariotas fotosintéticos oxigénicos. Los proclorofitos difieren de las cianobacterias en que los proclorofitos contienen clorofila b o d y carecen de ficobilinas.El oxígeno de la tierra se piensa que se originó a partir de la fotosíntesis cianobacteriana.

✓ Describa al menos tres formas en que las cianobacterias difieren de las bacterias púrpuras

✓ ¿Qué es un heterocisto y cuál es su función?

✓ ¿En qué se asemejan y difieren las cianobacterias, proclorofitos y cloroplastos?

✓ ¿Cuál es el significado ecológico de *Prochlorococcus*?

V PHYLUM 4: CLAMIDIAS

12.27 Clamidias

Géneros clave

Chlamydia

Los microorganismos del género *Chlamydia* son parásitos obligados con poca capacidad metabólica que forman un phylum separado (*véase* Figura 12.1). Se reconocen tres especies de Chlamydia (Tabla 12.33): *C. psittaci*, agente causal de la *psitacosis*; *C. trachomatis*, el productor del *tracoma* y otras enfermedades humanas; y *C. pneumoniae*, productor de diversos síndromes respiratorios (Tabla 12.33). La **psitacosis** es una enfermedad epidémica de pájaros que eventualmente puede pasar a humanos dando cuadros pseudoneumónicos. El **tracoma** es una enfermedad debilitante del ojo caracterizada por la formación de cicatrices y vascularización de la cornea que conduce a la ceguera. Otras estirpes de *C. trachomatis* infectan el tracto genitourinario, de modo que la infección clamidial es una enfermedad preponderante actualmente dentro del capítulo de enfermedades de transmisión sexual (Sección 26.13). La comparación y propiedades de *C. psittaci*, *C. trachomatis* y *C.penumonia* se muestran en la Tabla 12.33.

TABLA 12.33 Características diferenciales de las especies del género *Chlamydia*

Características	*C. trachomatis*	*C. psittaci*	*C. pneumoniae*
Hospedador	Humanos	Pájaros, mamíferos Ocasionalmente humanos	Humanos
Sitio común de infección	Membrana mucosa	Sitios múltiples	Mucosa respiratoria
Transmisión entre humanos	Común	Raro	Probable
Mol % GC	42-45	39-43	40
Homología (%) con *C. trachomatis* (hibridación DNA:DNA)[a]	100	10	10
DNA, Kpb/genoma (*E. coli* = 4600)	1000	550	~ 1000
Enfermedades humanas	Tracoma, otitis media Uretritis, inflamación de uretra Linfogranuloma venéreo	Psitacosis	Síndrome respiratorio
Enfermedades de animales domésticos	—	Clamidiasis aviar (loros, periquitos) Neumonía, artritis sinovial, Conjuntivitis (gatos, corderos, terneros, lechones)	—

[a] Para una explicación sobre hibridación DNA:DNA *véase* Sección 11.9.

Propiedades moleculares y metabólicas

Además de ser bacterias patógenas, las clamidias son intrigantes para cualquier microbiólogo a consecuencia de su biología, evolución y metabolismo. Los estudios bioquímicos muestran que tienen paredes celulares del tipo de las bacterias Gram negativas, que contienen DNA y RNA y que por tanto son células y no virus. Se reproducen por división binaria (Figura 12.84). La capacidad biosintética de las clamidias es más restringida que incluso la de las riquetsias, el otro grupo de bacterias parásitas intracelulares (*véase* Sección 12.13), de hecho durante algún tiempo se pensó que eran parásitos energéticos, obteniendo de sus parasitados no solo intermediarios biosintéticos sino también el propio ATP. Esto último, sin embargo no se mantiene después de concluir la secuencia del genoma de *C. trachomatis* (Sección 15.3), pues en él puede fácilmente reconocerse la presencia de genes para la síntesis de ATP e incluso los que dirigen la síntesis de peptidoglucano, lo que indica que tienen el potencial génico de poseer este compuesto de pared celular, aunque los análisis den resultados negativos.

Otras características interesantes del cromosoma de *C. trachomatis* incluyen el hecho de que carecen del gen codificante de la proteína FtsZ, una proteína clave implicada en la formación del septo durante la división (Sección 6.1) de la cual se pensaba era indispensable en toda célula de organización procariótica tanto *Bacteria* como *Archaea*. Además algunos de los genes tienen una clara apariencia eucariótica lo que indica que en su evolución los han tomado o adaptado a su parasitismo de células eucarióticas (Tabla 12.33; Secciones 21.7 y 26.13).

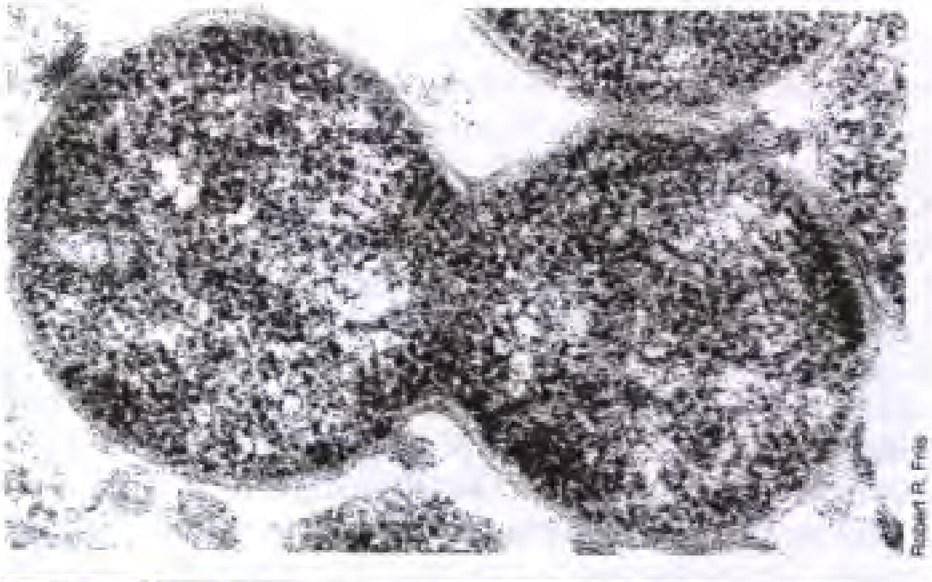

Robert R. Friis

Figura 12.84 Micrografía electrónica (corte fino) de una célula en división (cuerpo reticulado) (*véase* Figura 12.85) de *Chlamydia psittaci*, un miembro del grupo de psitacosis, en una célula de ratón en cultivos de tejidos. Diámetro de una clamidia de 1 μm.

Ciclo celular de *Chlamydia*

El ciclo celular de un miembro típico del género *Chlamydia* se muestra en la Figura 12.85. Se pueden reconocer dos tipos celulares: uno denso y pequeño llamado **cuerpo elemental**, que es relativamente resistente a la desecación y uno más grande y menos denso llamado **cuerpo reticulado** que se divide por división binaria que es la forma *vegetativa*. Los cuerpos elementales son células especializadas en la transmisión pero no son multiplicativas, mientras que los cuerpos reticulares se han especializado en la multiplicación intracelular. Al contrario que las riquetsias (*véase* Sección 12.13), las clamidias no se transmiten por artrópodos sino que primariamente son trasmitidos vía aérea al sistema respiratorio, de aquí la importancia de los cuerpos elementales a la desecación. Cuando un virus infecta una célula pierde la integridad y libera el ácido nucleico. Sin embargo, cuando un cuerpo elemental entra en una célula, aunque cambia de forma, permanece como una unidad estructural que crece y lleva a cabo división binaria. En la Figura 12.84 puede verse un cuerpo reticulado. Después de una serie de divisiones las células vegetativas se convierten en cuerpos elementales que se liberan cuando la célula se desintegra pudiendo infectar entonces otras células. Se han calculado tiempos de generación de 2-3 horas para los cuerpos reticulados, lo que es un crecimiento considerablemente más rápido que en las riquetsias. Por tanto, las clamidias parece que han evolucinado eficientemente como parásitos intracelulares a costa de perder funciones propias y desarrollar formas de resistencia para la transmisión (Tabla 12.34). No es por tanto sorprendente que las clamidias hayan sido asociadas con tan diferentes síndromes (Tabla 12.33; Sección 26.13).

✓ 12.27 Revisión de conceptos

Las clamidias son bacterias parásitas extremadamente pequeñas que producen diversas enfermedades en humanos. Poseen un genoma pequeño y son deficientes en muchas funciones metabólicas

- ✓ Utilizando los datos de la Tabla 12.34 como guía, ¿cómo pueden diferenciarse las clamidias de las riquetsias y de los virus?
- ✓ ¿Cuál es la diferencia entre el cuerpo elemental y el reticulado?
- ✓ ¿Qué sorpresas han salido a la luz al estudiar el genoma de las clamidias?

VI PHYLUM 5: PLANTOMICES/PIRELLULA

12.28 *Plantomyces*: una bacteria pedunculada filogenéticamente única

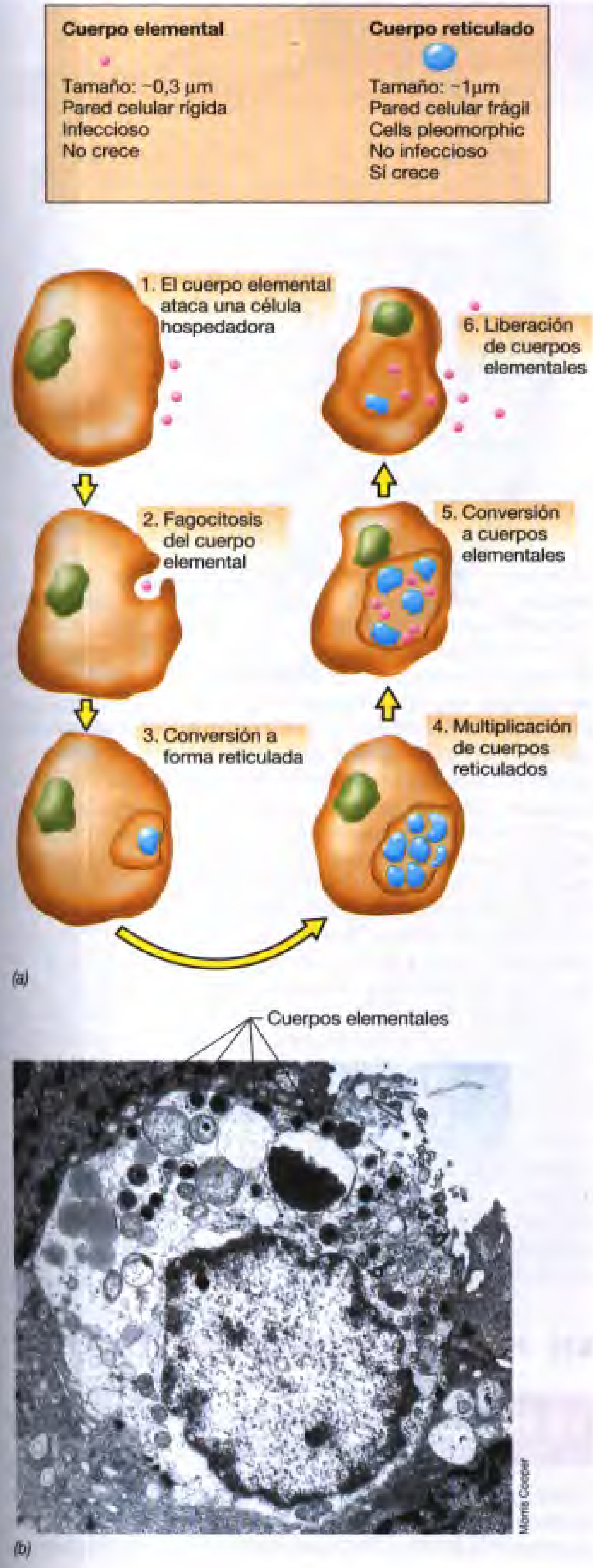
Géneros clave

Plantomyces
Pirellula
Gemmata

Este phylum contiene diversas bacterias únicas morfológicamente hablando que incluyen los géneros *Plantomyces, Pirellula, Gemmata* e *Isosphaera*. El mejor estudiado es Plantomyces (Figura 12.86). En la Sección 12.16 se consideraron bacterias prostecadas como *Caulobacter*. *Plantomyces* es también una bacteria prostecada, pero que al contrario que *Caulobacter* posee la prosteca formada de proteína y no contiene ni pared celular ni citoplasma (comparar la Figura 12.86 con la Figura 12.41). La prosteca de *Plantomyces* funciona presumiblemente como órgano de fijación pero es mucho más estrecho y fino que la de *Caulobacter*.

Otras características del grupo

Plantomyces y relacionados tienen también interés porque carecen de peptidoglucano y sus paredes celulares son del


Cuerpo elemental
Tamaño: ~0,3 µm
Pared celular rígida
Infeccioso
No crece
Cuerpo reticulado
Tamaño: ~1µm
Pared celular frágil
Cells pleomorphic
No infeccioso
Sí crece
1. El cuerpo elemental ataca una célula hospedadora
2. Fagocitosis del cuerpo elemental
3. Conversión a forma reticulada
4. Multiplicación de cuerpos reticulados
5. Conversión a cuerpos elementales
6. Liberación de cuerpos elementales
(a)
Cuerpos elementales
(b)

Morris Cooper

Figura 12.85 Ciclo infectivo de *Chlamydia*. (a) representación esquemática: el ciclo completo lleva unas 48 horas. (b) Infección humana por *Chlamydia*. Una célula infectada de la trompa de Falopio está liberando, cuerpos elementales maduros.

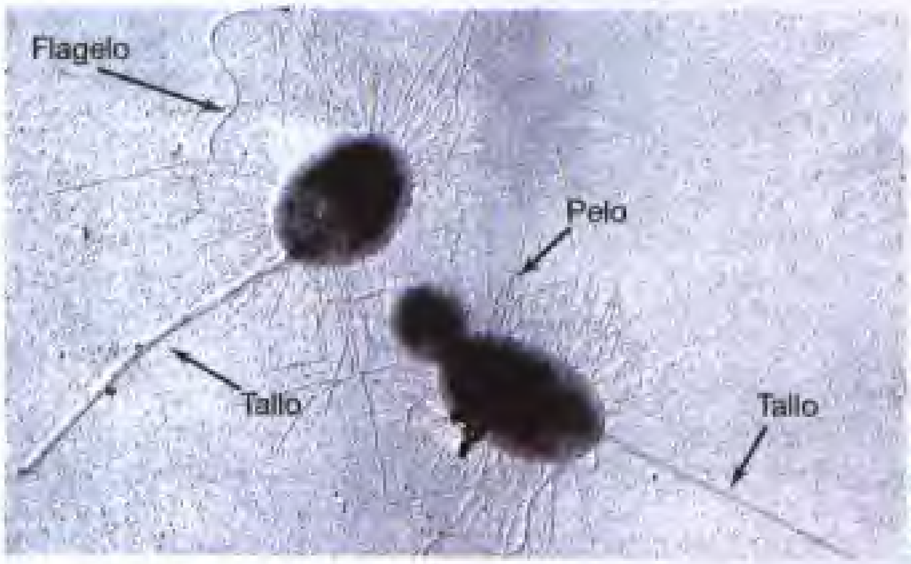
TABLA 12.34 Comparación de parásitos intracelulares estrictos: riquetsias, clamidias y virus

Propiedad	Riquetsias	Clamidias	Virus
Estructural			
Ácido nucleico	RNA y DNA	RNA y DNA	RNA o DNA (mono o bicatenario nunca ambos)
Ribosomas	Presentes	Presentes	Ausentes
Pared celular	Peptidoglicano presente	Peptidoglicano presente[a]	Sin pared
Integridad estructural durante la multiplicación	Se mantiene	Se mantiene	Se pierde
Capacidades metabólicas			
Síntesis de macromoléculas	Si	Si	Maquinaria del huésped
Sistema generador de ATP	Si	Si	No
Oxidación de glutamato	Si	No	No
Sensibilidad a antibióticos antibacterianos	Si	Si (excepto penicilina)	Resistentes
Filogenia	Alfa proteobacterias	Phylum de clamidias	No son células

[a] Se ha secuenciado el genoma de *C. trachomatis* (*véase* Sección 15.3), y los genes para la síntesis de peptidoglicano y ATP están presentes. No obstante la ausencia de sensibilidad a la penicilina de las clamideas pone en duda la existencia de peptido glicano.

tipo de capa S (Sección 4.8) hecha de proteína que contiene grandes cantidades de cisteína (como cistina) y prolina. Como podría esperarse de un organismo que carece de peptido glucano, estos microorganismos son resistentes a antibióticos tales como penicilinas y cefalosporinas, drogas que interrumpen la síntesis de peptidoglucano. Como en el caso de *Caulobacter* (Figura 12.41), *Plantomyces* es también una bacteria gemante con una especie de ciclo celular. Así, células nadadoras se fijan a una superficie, desarrollan una prosteca desde el punto de fijación y generan una nueva célula por gemación en el polo opuesto. Esta célula hija desarrolla un flagelo, se separa y comienza un nuevo ciclo. *Plantomyces* es quimioorganotrofo aerobio facultativo que crece por respiración o fermentación de los azúcares. El hábitat es fundamentalmente acuático, tanto dulce como salino, y el género *Isosphaera* es filamentoso que se mueve por deslizamiento habitando fundamentalmente manantiales de agua caliente. Como *Caulobacter* (*véase* Sección 12.16), el aislamiento de *Plantomyces* y relacionados debe hacerse en medios diluidos pudiendo practicarse el enriquecimiento con penicilina por carecer de pared celular. Una de las características que más llaman la atención en este phylum es la compartimentalización. Vimos en el Capítulo 2 las diferencias más importantes entre organización pro y eucariótica, especialmente en lo que concernía a la membrana nuclear (Sección 2.2). Sin embargo, los plantomicetos son únicos entre todos los procariotas conocidos por poseer estructuras internas muy desarrolladas, incluyendo lo que podría tomarse por membrana nuclear. Por ejemplo, en la bacteria Gemmata (Figura 12.87), el nucleoide está rodeado por una membrana nuclear pero el DNA que constituye este nucleoide forma un círculo genético superenrollado y por tanto típicamente procariótico (Sección 7.3). Pero está muy condensado y permanece separado del citoplasma restante por una auténtica unidad de membrana (Figura 12.87).

Todas las especies de los plantomicetos que han sido estudiadas hasta el momento poseen estas compartimentalizaciones internas. Algunos carecen de DNA y por tanto poseen otras funciones (por ejemplo metabólicas, Sección 17.12). No hay ningún otro grupo de procariotas cuya estructura recuerde tanto a la de un eucariota. De hecho la existencia de los plantomicetos difumina un poco la clara distinción que hasta hace pocos años existía entre pro y eucariotas. Sin embargo filogenéticamente hablando los plantomicetos están perfectamente ubicados en el interior del dominio *Bacteria* (Figura 12.1).



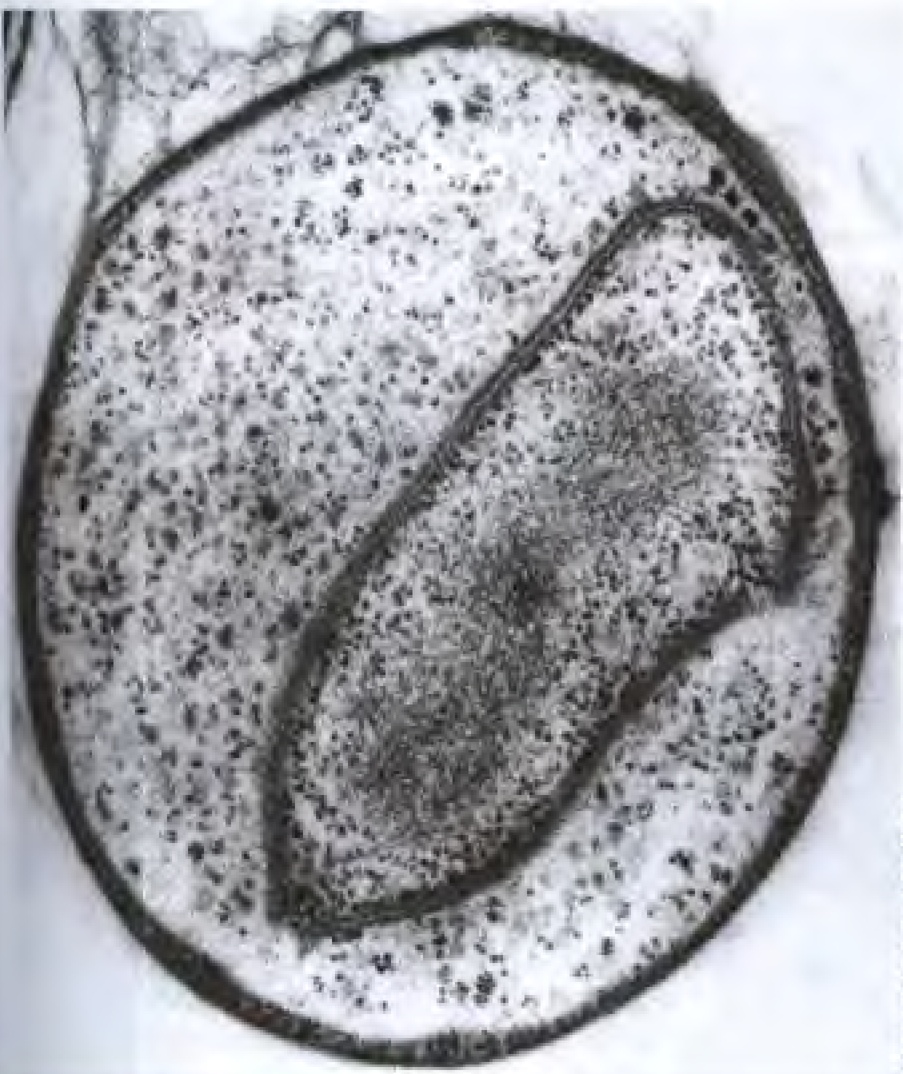
John Bauld

Figura 12.86 Una Micrografía electrónica (sombreado) de *Planctomyces maris*. Tamaño celular de 1-1,5 µm de largo. Nótense también los flagelos en cada célula así como la yema que se está formando.

VII PHYLUM 6: VERRUCOMICROBIOS

12.29 *Verrucomicrobium y Prosthecobacter*

Este phylum de bacterias comparte homología con las proteobacterias prostecadas (*véase* Sección 12.16), como es precisamente la formación de estos apéndices citoplasmáticos



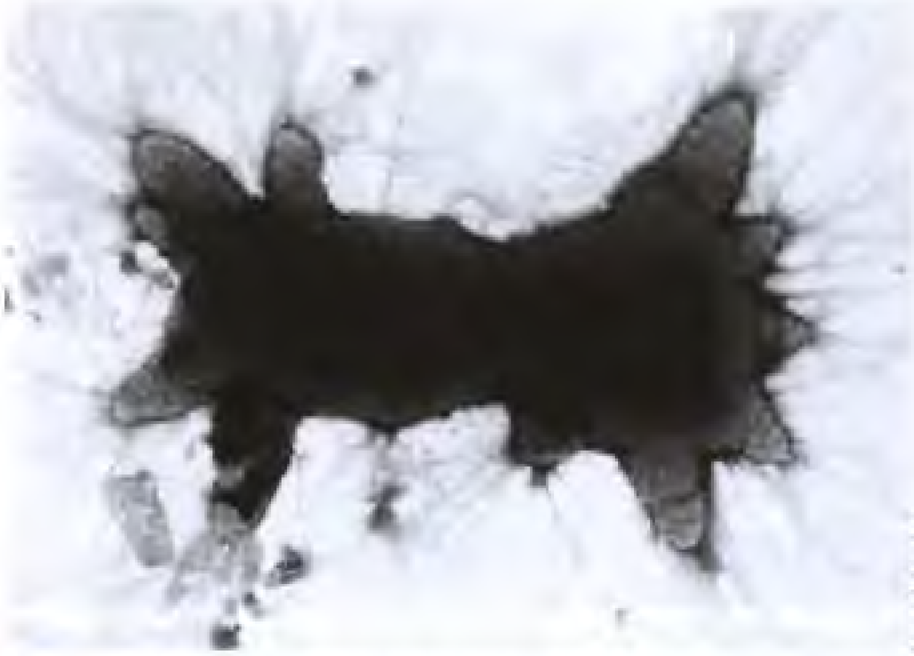
Margaret Lindsay y John Fuerst

Figura 12.87 Micrografía electrónica de transmisión (corte fino) de una célula de *Gemaza obscuriglobus* mostrando el nucleoide rodeado de una envoltura nuclear. Diámetro celular de 1,5 µm.

que llamamos prostecas. El género *Verrucomicrobium* y el *Prosthecobacter* originan dos o más prostecas por célula (Figura 12.88). También y al contrario que *Caulobacter* que contiene una única prosteca y que produce células flageladas y no flageladas (*véase* Sección 12.16), *Verrucomicrobium* y *Prosthecobacter* se dividen simétricamente de modo que tanto la célula madre como la hija contienen prostecas en el momento de la división. La especie V. spinosa hace eferencia precisamente a esta apariencia debido a que las células poseen varias prostecas. Sin embargo poseen peptidoglucano en la pared celular siendo aerobias facultativas, capaces tanto de respirar como de fermentar diversos azúcares. Están muy distribuidos en la naturaleza encontrándose en hábitat acuáticos tanto de agua dulce como salada así como en suelos agrícolas y de bosques. Desde un punto de vista filogenético los verrucomicrobios son diferentes del resto de las bacterias (Figura 12.1). Presentan cierta relación con los plantomicetos pero a la vez suficientemente diferentes como para justificar su propio linaje.

VIII PHYLUM 7: FLAVOBACTERIAS

Este phylum de *Bacteria* comprende una mezcla de diferentes tipos fisiológicos desde a aerobios hasta anaerobios estrictos pasando por los anaerobios facultativos, todos ellos unidos por un sutil hilo conductor filogenético y se encuentran en hábitat muy diversos; en esta sección se hace referencia solamente a dos géneros importantes dentro del grupo.



Heinz Schlesner

Figura 12.88 Micrografía electrónica de transmisión (tinción negativa) de una célula en división de *Verrucomicrobium spinosum*. Diámetro celular de 1 µm. Nótese las prostecas verrucosas.

12.30 *Bacteroides* y *Flavobacterium*

Géneros clave

Bacteroides
Flavobacterium

El género *Bacteroides* comprende anaerobios estrictos no esporulados, sacarolíticos, fermentándolos hasta principalmente, acetato y succinato. Normalmente las especies son comensales del intestino de humanos y otros animales (Secciones 19.11 y 21.4). De hecho las especies de *Bacteroides* son las dominantes numéricamente hablando en el intestino grueso humano, pudiendo llegar hasta 10^{10}-10^{11} células por gramo de heces. También pueden ser patógenos y de hecho suelen ser la causa de infecciones por anaerobios más frecuente en humanos. Son bacterias diferentes a las demás en el sentido de que pueden sintetizar esfingolípidos, un grupo heterogéneo de lípidos que se caracterizan por poseer esfingosina en lugar de glicerol (Figura 12.89). Esfingolípidos tales como esfingomielina, cerebrósidos y gangliósidos son comunes en los tejidos de los mamíferos, especialmente en el cerebro y otras partes del sistema nervioso.

Por el contrario, el género *Flavobacterium* se encuentra principalmente en ambientes acuáticos tanto agua dulce como salada así como en alimentos y en plantas procesadoras de los mismos. Las colonias son normalmente amarillas, de aquí el nombre, y fisiológicamente tienen bastante restringido el número de fuentes de carbono que pueden utilizar, siendo la glucosa fundamentalmente. Rara vez son patógenos, pero una especie, *F. Meningosepticum* puede estar

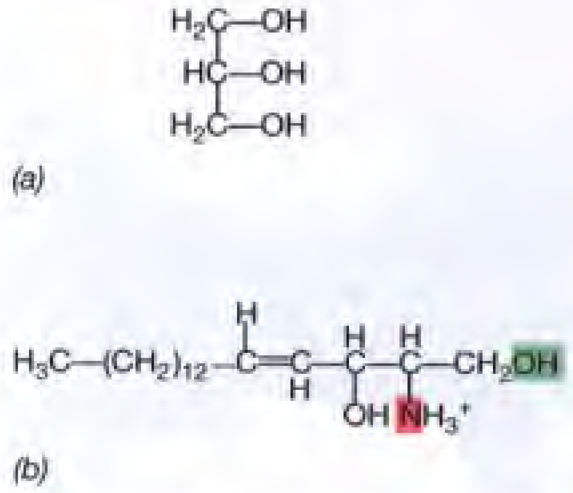


Figura 12.89 Comparación del glicerol (a) con la esfingosina (b). En los esfingolípidos característicos de las especies de *Bacteroides*, el alcohol esterificante es la esfingosina; un ácido graso establece un enlace peptídico a través del átomo de nitrógeno (en rojo) y el oxidrilo terminal —OH (en verde) y puede contener diversos compuestos como la fosfatidil colina (esfingomielina) o diferentes azúcares (cerebrósidos y gangliósidos).

asociada a casos de meningitis infantiles no meningocócicas. Otros géneros importantes del grupo son psicrofílicos o al menos psicrotolerantes (Sección 6.9). Éstos incluyen en particular *Polaribacter* y *Psychroflexus*. Muchos otros géneros del grupo pueden crecer bien por debajo de 20°C.

IX PHYLUM 8: GRUPO CYTOPHAGA

Géneros clave

Cytophaga
Sporocytophaga
Flexibacter

12.31 *Cytophaga* y géneros relacionados

Los microorganismos de este grupo son bacilos largos y delgados, con los extremos terminados en punta frecuentemente y que se mueven por deslizamiento (Figura 12.90*a*,*b*). El género *Sporocytophaga* es semejante a *Cytophaga* solo que origina formas de resistencia cocaceas denominadas *microcistos* (Figura 12.90 *c*, *d*) que son semejantes a los encontrados en las mixobacterias (*véase* Sección 12.17). Están ampliamente distribuídos en el suelo y aguas. Suelen digerir eficientemente los polisacáridos tales como celulosa (Figura 12.90*c*), agar (Figura 12.90*a*) o quitina. Las que degradan la celulosa pueden ser fácilmente aisladas poniendo pequeñas muestras de suelo sobre hojas de papel de filtro de celulosa sobre la superficie de agar con sales minerales. Las bacterias degradan y digieren las fibras de celulosa formando colonias diseminadas (Figura 12.90*c*). Las citofagas no producen enzimas solubles, sino que las celulasas permanecen unidas a las células por lo que para degradar las microfibrillas de celulosa deben estar fuertemente ancladas a las mismas. *Cytophaga* puede crecerse en agar que contenga celulosa. Su presencia se revela por la formación de halos de clarificación característicos a medida que se digiere la celulosa (Figura 12.90*c*; *véase* también la Figura 17.62).

Las especies de los géneros *Cytophaga* y *Sporocytophaga* son aerobios obligados y probablemente son las responsables de la mayor parte de la degradación de la celulosa en ambientes aeróbicos. Algunas especies de *Cytophaga* son patógenos para peces pudiendo representar verdaderos problemas en piscifactorías. Las dos más importantes son *C. columnaris* que causa la enfermedad columnar y *C. psychrophila* que produce el llamado síndrome del agua fría. Ambas enfermedades afectan principalmente a peces estresados tales como los que viven en aguas contaminadas o muy confinados en espacios pequeños, como es habitual en las operaciones y manipulaciones de las piscifactorías. Los peces infectados muestran destrucción de tejidos, frecuentemente alrededor de las agallas, lo que puede explicar que las cepas aisladas sean fuertemente proteolíticas.

El género *Flexibacter* difiere de las citofagas en que normalmente requieren medios complejos para crecer y no son celulolíticos. Las células de algunas *Flexibacter* pueden sufrir cambios en su morfología desde filamentos largos y delgados con movilidad deslizante carentes de tabiques transversales hasta bacilos cortos inmóviles. Muchas especies son pigmentadas debido a pigmentos carotenoídicos localizados en la membrana citoplasmática o bien pigmentos relacionados denominados *flexirubinas* localizados en la OM —las especies de *Flexibacter* son comunes en suelos y aguas dulces y ninguno ha sido identificado como patógeno.

✓ 12.28-12.31 Revisión de conceptos

El grupo *Plantomyces* contiene bacterias gemantes y prostecadas, mientras que las flavobacterias contiene bacterias Gram negativas móviles por flagelos o por deslizamiento y asociados con animales o en el suelo. Los miembros de Verrucomicrobia se distinguen por poseer células multiprostecadas.

- ✓ ¿Qué es característico de la pared celular y del DNA de *Plantomyces?*
- ✓ ¿En qué difiere la prosteca de *Plantomyces* de la de *Caulobacter?*
- ✓ ¿Dónde puede encontrar grandes cantidades de *Bacteroides?*
- ✓ Describa un método para aislar *Cytophaga* en la naturaleza.

X PHYLUM 9: *BACTERIA* VERDES DEL AZUFRE

12.32 *Chlorobium* y otras *Bacteria* verdes del azufre

Géneros clave

Chlorobium
Prosthechochloris
«*Chlorochromatium*»

Las bacterias verdes del azufre constituyen un grupo filogenético distintivo de fototrofos inmóviles anoxigénicos y anaerobios estrictos. Es un grupo morfológicamente va-

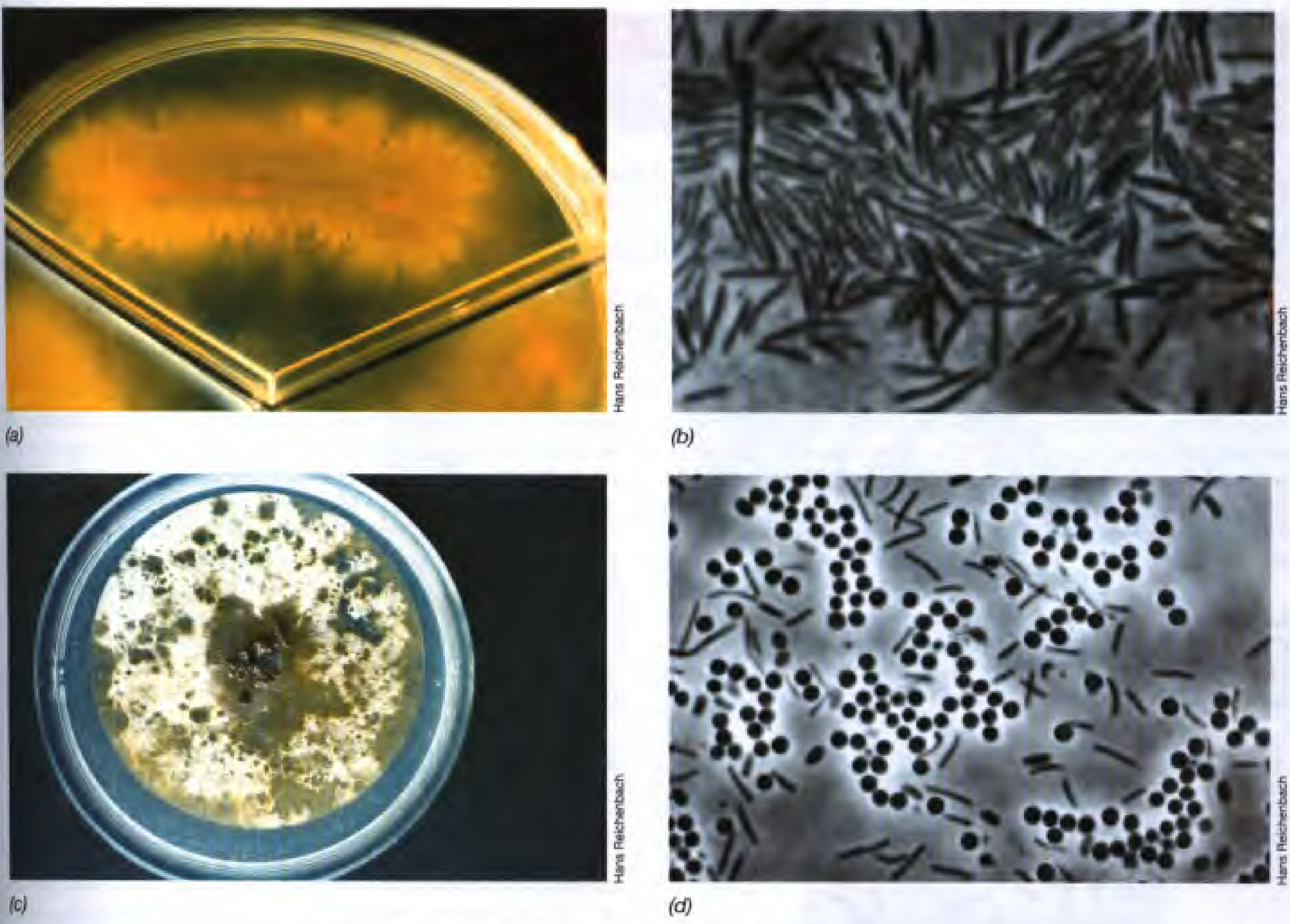


Figura 12.90 *Cytophaga* y *Sporocytophaga*. (a) Estría de una especie marina de *Cytophaga* agarolítica hidrolizando el agar en placa Petri. (b) Micrografía de contraste de fases de células de *C. hutchinsonii* creciendo sobre papel de filtro de celulosa (diámetro celular de 1,5 µm). (c) Colonias de *Sporocytophaga* creciendo en celulosa. Nótense las zonas claras donde la celulosa ha sido degradada. (d) Micrografía de contraste de fases de las células bacilares y microcistos esféricos de *Sporocytophaga myxococcoides* (diámetro de las células de 0,5 µm y de los microcistos 1,5 µm).

riado e incluye desde bacilos cortos hasta muy largos (Tabla 12.35 y Figura 12.91). Como las bacterias rojas utilizan H_2S como donador de electrones oxidándolo primero hasta S^0 y después hasta SO_4^{2-}. Pero al contrario que en ellas, el azufre que pueda originarse, permanece en el *exterior* de la célula (Figura 17.17*b*). La mayoría de las especies pueden también asimilar un puñado de compuestos orgánicos en presencia de luz (esto es *fotoheterotrofia*, Sección 17.4). La autotrofia sin embargo, no depende de las reacciones del ciclo de Calvin como en el caso de las bacterias rojas sino del ciclo reverso del ácido cítrico (Sección 17.7), una forma única de metabolismo entre los seres fototróficos.

Pigmentos y ecología

Las bacterioclorofilas que se encuentran en las bacterias verdes del azufre incluyen la bacterioclorofila *a* o bien la *c*, *d* o *e*. Estas últimas funcionan como recolectoras de luz (Sección 17.2) y se depositan en estructuras típicas conocidas como **clorosomas** (Figura 12.92). Los clorosomas son cuerpos oblongos con membrana sin estructura de unidad de membrana y que se encuentran unidas a la membrana citoplasmática en la periferia de las células (Figura 12.92 y Figura 17.7). Estudios sobre transferencia de energía en estas bacterias (Sección 17.2) han demostrado que la luz absorbida por las bacterioclorofilas *c*, *d* o *e* en el clorosoma es embocada hacia la bacterioclorofilas *a* que se encuentra en la membrana citoplasmática, que es donde ocurre la síntesis real de ATP (Figura 17.7). Se conocen tanto especies verdes como marrones (Figura 12.93; Figura 17.9)

Como en el caso de las bacterias rojas del azufre (*véase* Sección 12.2*)*, las verdes viven en ambientes acuícolas anaerobios con abundante H_2S (en general, son más tolerantes al sulfídrico que las rojas). Debido a que el clorosoma es muy eficiente como recolector de luz, se requiere muy poca luz para soportar la función fotosintética en estas bacterias y normalmente se encuentran a mayores profundidades que el resto de los organismos fotosintéticos. Una especie del género *Chlorobium*, *C. tepidum* (Figura 12.92) es termofí-

TABLA 12.35 Géneros y características de bacterias verdes del azufre

Características	Género	Color de los cultivos	Número de especies	DNA (GC mol %)
Sin vesículas de gas:				
Bacilos inmóviles rectos o curvados (Figura 12.91-a)	*Chlorobium*	Verde o marrón	8	49-58
Esferas u ovaladas, inmóviles prostecadas	*Prosthecochloris*	Verde o marrón	2	50-56
Con vesículas de gas:				
Bacilos inmóviles ramificados en una red laxa (*véase* Figura 12.91-b)	*Pelodictyon*	Verde o marrón	4	48-58
Esferas con prostecas	*Ancalochloris*	Verde	1	—
Bacilos deslizantes	*Chloroherpeton*	Verde	1	47

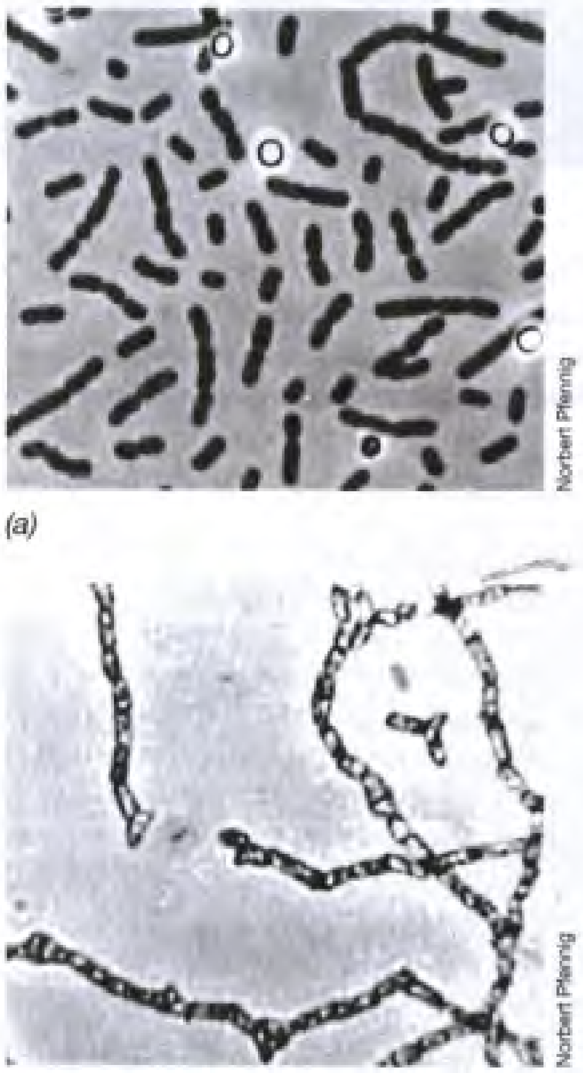
lico y forma matas muy densas en manantiales azufrados de agua caliente (Figura 12.92). Su genoma de 2.1 megabases ya se ha secuenciado completamente y de hecho ha sido el primer genoma de un fototrofo anoxigénico (Sección 17.0); también es importante por ser transformable y presentar una conjugación definida.

Los consorcios de bacterias verdes del azufre

Ciertas bacterias verdes del azufre pueden formar asociaciones estrechas con bacterias quimioorganotrofas en las que ambos se benefician, tales asociaciones se denominan **consorcios**. El componente fototrófico se denomina *epibionte* y aparece físicamente unido al componente no fototrófico (Figura 12.94), aunque el mecanismo de unión no está claro. El término *Chlorocromatium aggregatum* se ha utilizado para describir uno de estos consorcios; este término sin embargo no tiene implicaciones taxonómicas porque se refiere a dos organismos más que a uno sólo.

El consorcio C. aggregatum es de color verde porque el epibionte es una bacteria verde azufrada que contiene bacterioclorofila c o d y carotenoides de color verde y que rodean una célula no fotosintética. Una estructura similar conocida como *Pelochromatium roseum* es de color pardo. En otros consorcios el epibionte tiene forma de media luna (Figura 12.94 *b*, *c*) por lo que es razonable asumir que en la naturaleza puede existir una gran variedad de consorcios.

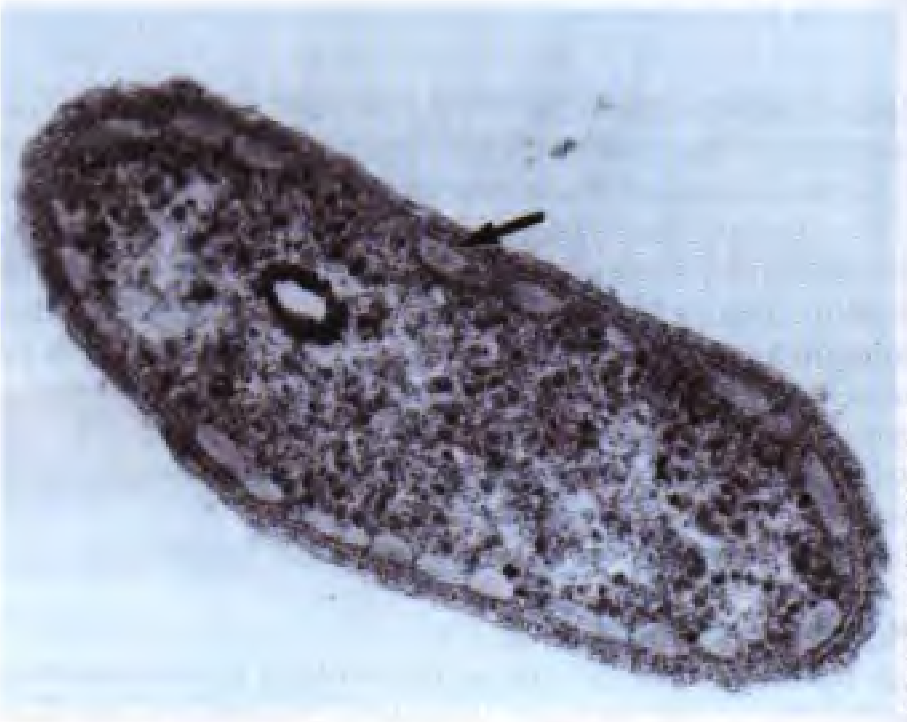
Algunos han sido crecidos en el laboratorio. Por término medio el consorcio C. *aggregatum* (Figura 12.94) contiene 12 epibiontes por célula central mientras que el P. roseum contiene alrededor de 20. Existen evidencias sólidas para pensar que los epibiontes son de hecho bacterias verdes del azufre; estas evidencias incluyen el que sus cro-



Norbert Pfennig

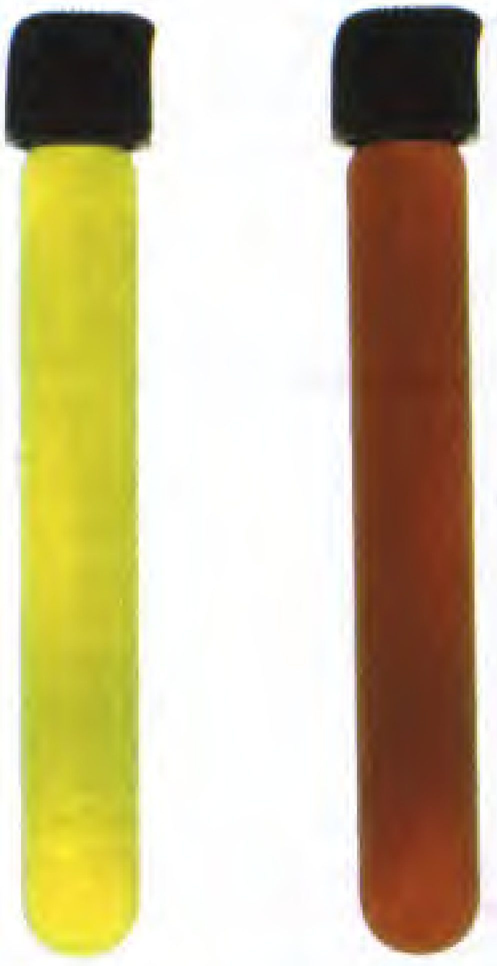
Norbert Pfennig

Figura 12.91 Bacterias fototróficas verdes del azufre. (a) *Chlorobium limicola*; diámetro celular de 0,8 µm. Nótense los gránulos de azufre depositados extracelularmente. (b) *Pelodictyon clathratiforme*, una bacteria que forma un entramado tridimensional; diámetro celular de 0,8 µm.



F. Rudy Turner y Michael T. Madigan

Figura 12.92 Micrografía electrónica de transmisión (corte fino) de la bacteria verde del azufre *Chlorobium tepidum*. Nótense los clorosomas (flecha) en la periferia celular. Diámetro celular de 0,7 µm.



Deborah O. Jung

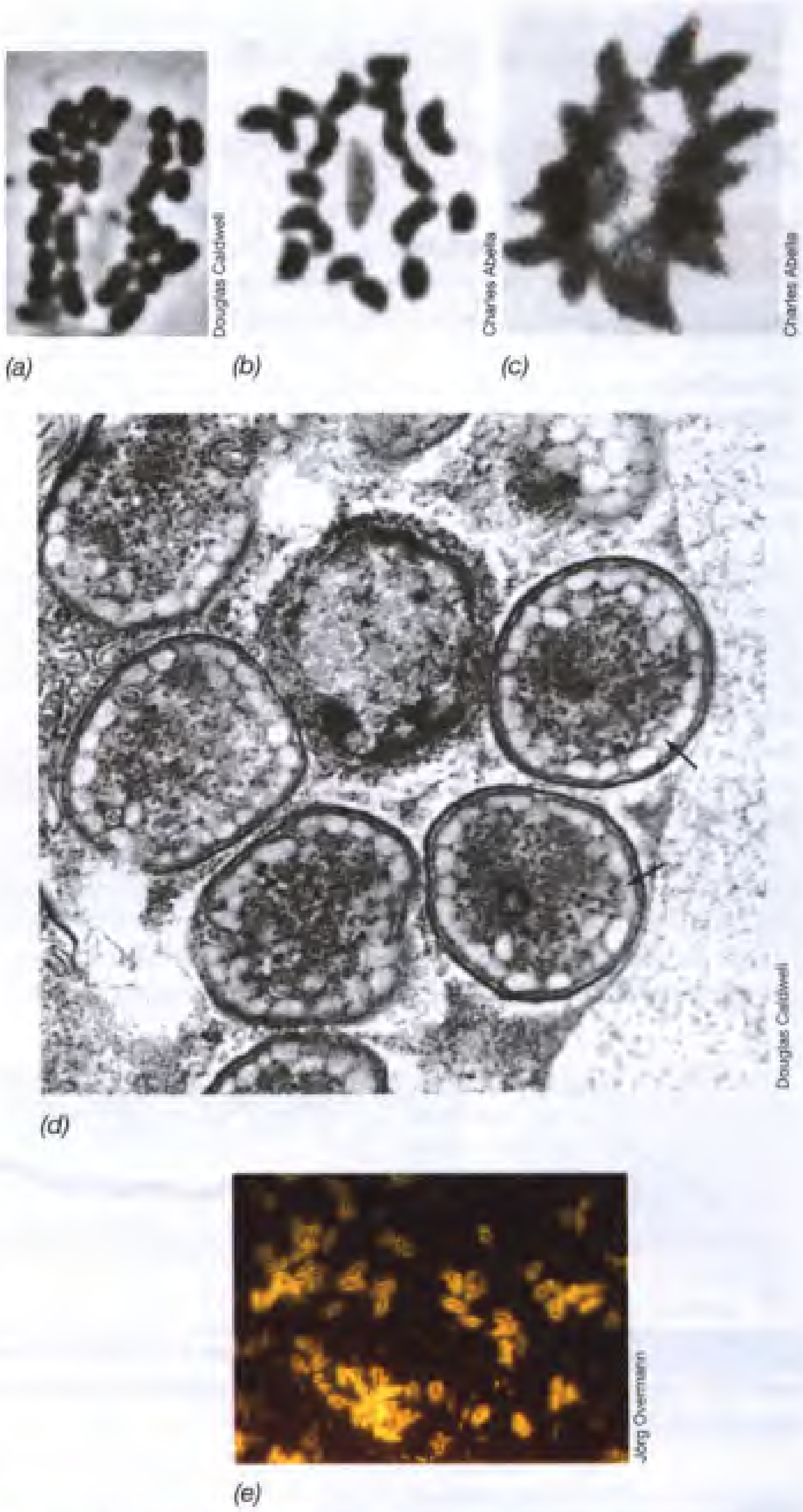
Figura 12.93 Clorobios verdes y marrones. Cultivos en tubo de (a) *Chlorobium tepidum* y (b) *Chlorobium phaeobacteroides*. Las células de *C. tepidum* contienen bacterioclorofila *c* y una serie de carotenoides verdes, mientras que las células de *C. phaeobacteroides* contienen bacterioclorofila e isorenierateno, un carotenoide de color marrón. Para las estructuras de los carotenoides específicos verde y marrón *véase* Figura 17.9.

mosomas procarióticos son bien visibles en cortes finos (Figura 12.94*d*). Por otra parte, el tratamiento del consorcio con un oligonucleótido fluorescente específico para el 16S rRNA de bacterias verdes del azufre (tecnología FISH, Secciones 11.6 y 18.4) induce específicamente fluorescencia en el epibionte y no en la célula central (Figura 12.94 e). Los estudios de laboratorio han demostrado también que ambas células se dividen en sincronía, lo que sugiere una forma de intercomunicación entre ambas. La razón de por qué se forman estas asociaciones no está claro; los estudios combinados de laboratorio y de campo sugieren que los epibiontes en estos consorcios se han adaptado a bajo régimen de luz y de sulfídrico y que la función de la célula central es movilizar al epibionte en la columna de agua buscando las condiciones óptimas para la fotosíntesis.

✓ 12.32 Revisión de conceptos

Las bacterias verdes del azufre son anaerobias obligadas, que llevan a cabo fotosíntesis anoxigénica en estructuras particulares llamadas clorosomas. Pueden crecer con intensidades de luz muy bajas y oxidar el H_2S hasta S^0 y SO_4^{2-}.

- ✓ ¿Qué pigmentos se encuentran en el clorosoma?
- ✓ ¿Qué es único y característico de la autotrofia de *Chlorobium* (Sección 17.7)?



(a) (b) (c)

(d)

(e)

Douglas Caldwell, Charles Abella, Charles Abella, Douglas Caldwell, Jörg Overmann

Figura 12.94 Consorcio de bacterias verdes del azufre. (a-c) Micrografía de contraste de fases y (d) Micrografía electrónica de transmisión (corte fino) del consorcio «*Chlorochromatium aggregatum*» o «*Pelochromatium*». En (a-c) el organismo central no fototrófico posee un color mucho más claro que las bacterias pigmentadas fototroficas. Nótense los clorosomas (flechas) en (d). El consorcio global tiene 3 × 6 µm. (b, c) Epibiontes en forma de media luna en el consorcio «*Pelochromatium*» de un lago estratificado de Wisconsin. La célula central incolora en ambas fotografías es de 2 µm de largo. (e) Tinción filogenética (*véase* Sección 18.4) de «*Chlorochromatium aggregatum*». La tinción amarilla se debe a una sonda de ácido nucleico específica para bacterias verdes del azufre. Nótese que solamente se tiñen los epibiontes. El número de epibiontes es de 10-20 por célula central (no fototrófica). Nótese el contacto íntimo entre los epibiontes y la célula central en (d). Este contacto puede facilitar la comunicación intercelular en el consorcio necesario para controlar las posibles respuestas de quimiotaxis o fototaxis.

UNIVERSIDAD DE TALCA
BIBLIOTECA CENTRAL

✓ ¿Qué evidencia apoya la idea de que los epibiontes de los consorcios son auténticas bacterias verdes del azufre?

XI PHYLUM 10: ESPIROQUETAS

12.33 Espiroquetas

Géneros clave

Spirochaeta
Treponema
Cristispira
Leptospira
Borrelia

Las espiroquetas son bacterias Gram negativas, móviles, enrolladas en forma de muelle y flexibles (Figura 12.95). Estos procariotas, únicos desde el punto de vista morfológico forman un linaje de *Bacteria* (*véase* Figura 12.1). Están ampliamente distribuidos en medios acuáticos y en animales y en algunos casos pueden ser patógenos incluyendo enfermedades de transmisión sexual en humanos como es la sífilis (Sección 26.12).

La célula consta de un «cilindro protoplasmático». Formado por el «cuerpo» de la espiroqueta, es decir, el citoplasma, la pared celular y la membrana plasmática (Figura 12.96). La movilidad la confiere un manojo de flagelos que emergen de cada extremo (Figura 12.96). Sin embargo, a diferencia de los flagelos típicos bacterianos (*véase* Sección 4.10) los flagelos de las espiroquetas, se doblan hacia atrás desde cada polo sobre el cilindro protoplasmático quedando localizados en el espacio periplásmico y se encuentran en la parte intermedia de la célula en lo que algunos han llamado *endoflagelos*. Los endoflagelos y el cilindro protoplasmático están rodeados de una *vaina externa*, flexible y multilamelar (Figura 12.96)

Movilidad de las espiroquetas

Cada endoflagelo está anclado en un extremo y se extiende alrededor de 2/3 de la longitud de la célula. Los endoflagelos rotan de forma rígida como lo hacen los flagelos típicos bacterianos (*véase* Sección 4.10). Como el cilindro protoplásmico es también rígido y la vaina externa es flexible cuando ambos endoflagelos rotan en la misma dirección el cilindro lo hace en dirección contraria originando un momento de torsión como se indica en la Figura 12.96*b*. En un medio líquido esto causa que la espiroqueta se mueva por flexión debido al torsión que la rotación de los endoflagelos ejerce en los extremos del cilindro protoplasmático (Figura 12.96*b*). Por tanto y a pesar de que los flagelos de las espiroquetas no se extienden hacia fuera de la célula, sino que en su lugar permanecen encerrados en el espacio periplásmico, también generan movilidad en este grupo particular de procariotas; ciertamente los movimientos no son suaves y continuos como el que se detecta en otras bacterias sino de flexión o de muelle, pero movimiento en definitiva.

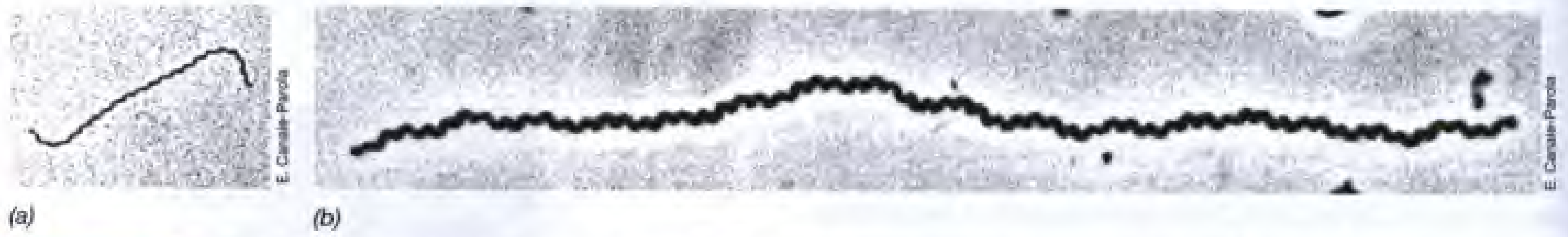


Figura 12.95 Dos espiroquetas observadas con los mismos aumentos mostrando la variabilidad en tamaño del grupo. (a) *Spirochaeta stenostrepta*, por microscopía de contraste de fases; diámetro celular de 0,25 µm. (b) *Spirochaeta plicatilis*; diámetro celular de 0,75 µm pero puede llegar hasta 250 µm (0,25 mm) de longitud.

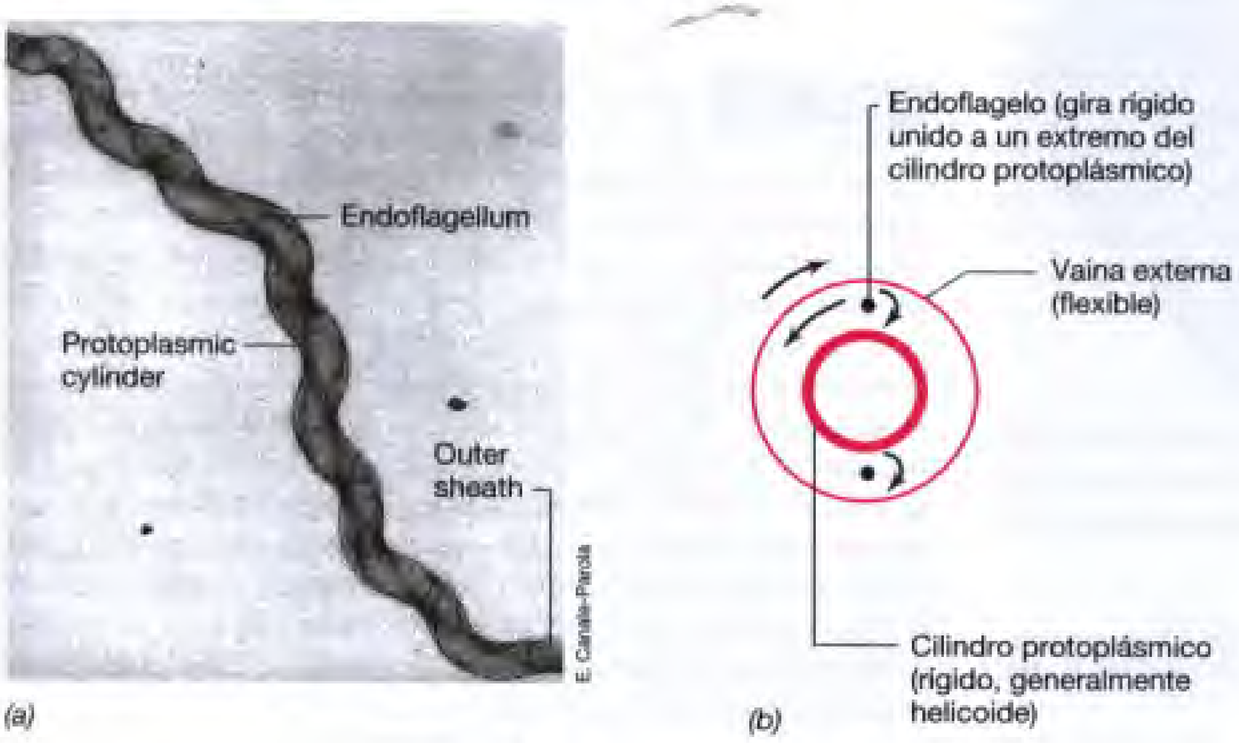

Endoflagellum
Protoplasmic cylinder
Outer sheath
E. Canale-Parola
(a)
Endoflagelo (gira rígido unido a un extremo del cilindro protoplásmico)
Vaina externa (flexible)
Cilindro protoplásmico (rígido, generalmente helicoide)
(b)

Figura 12.96 (a) Micrografía electrónica de transmisión (tinción negativa) de *Spirochaeta zuelzerae*, mostrando la posición del endoflagelo. Diámetro celular de 0,3 µm. (b) Sección transversal de una célula de espiroqueta mostrando la disposición del cilindro protoplásmico, endoflagelos y vaina externa, así como la manera por la que la rotación del endoflagelo puede generar a su vez la rotación del cilindro protoplásmico y la rotación de la vaina externa (en sentido contrario). Si la vaina está libre, la célula rotará y se moverá sobre un eje. Si la vaina está en contacto con una superficie sólida la célula se arrastrará hacia delante.

Clasificación

Las espiroquetas se clasifican en ocho géneros primarios sobre la base de su hábitat, patogenicidad, RNA ribosómico y características morfofisiológicas. La Tabla 12.36 recoge los principales géneros así como sus características.

Spirochaeta y *Cristispira*

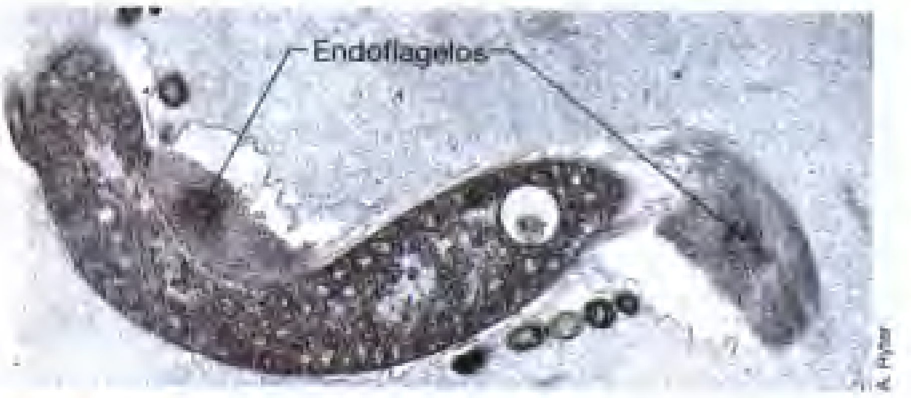
El género *Spirochaeta* incluye espiroquetas anaerobias y anaerobias facultativas de vida libre. Estos microorganismos son comunes en medios acuáticos tales como el lodo de los ríos, estanques, lagos y océanos. Una especie del género *Spirochaeta* es *S. plicatilis* (Figura 12.95*b*), una espiroqueta bastante grande, probablemente anaerobia, tanto en lodos de agua dulce como salada, pero ricos en H_2S. Los endoflagelos son de 18 a 20 que van rodeando a todo el cilindro protoplasmático. Otra especie *S. stenostrepta* ha sido cultivada tal y como se indica en la Figura 12.95*a*. Es un anaerobio estricto comúnmente aislable en lodos negros sulfurosos. Fermenta los azúcares hasta etanol, acetato, CO_2 y H_2 por la ruta glucolítica. La especie *S. aurantia* es un aerobio facultativo de color naranja pero que puede fermentar los azúcares hasta etanol u oxidarlos en aerobiosis hasta acetato y CO_2.

Del intestino de las termitas se ha aislado una espiroqueta poco habitual que es muy celulolítica, siendo capaz de degradar la celulosa hasta glucosa que es rápidamente fermentada por la espiroqueta; el hidrógeno y anhídrido carbónico, generado por la fermentación, son convertidos a acetato, lo que convierte a esta bacteria en *homoacetógena* (Sección 17.16). Esta es la primera vez que se detecta una forma de generar energía tan característicamente fuera del grupo de los clostridios y bacterias relacionadas (*véase* Sección 12.20). Esta espiroqueta también fija nitrógeno (Sección 17.16) propiedad no descrita previamente en espiroquetas.

El género *Cristispira* (Figura 12.97) contiene organismos de distribución única, encontrándose característicamente en *la protuberancia cristalina* de moluscos, como almejas y ostras. La protuberancia cristalina (estilete) es un cilindro semisólido flexible dentro de un saco y que está rotando en continuo rozamiento contra la superficie del tracto digestivo moliendo y mezclando los alimentos. Las cristispiras

TABLA 12.36 Géneros de espiroquetas y características

Genero	Dimensiones (μm)	Número de especies reconocidas	Características generales	Número de endoflagelos	DNA (GC mol %)	Hábitat	Enfermedad
Cristispira	30-150 × 0,5-3,0	1	3-10 vueltas completas; flagelos visibles en microscopio de contraste de fases	> 100	—	Tracto digestivo de moluscos	Ninguna
Spirochaeta	5-250 × 0,2-0,75	14	Anaerobios o anaerobios facultativos; poco o muy enrollados	2-40	50-65	Acuáticos; vida libre; agua dulce o salada	Ninguna
Treponema	5-05 × 0,1-0,4	20	Microaerófilos o anaerobios vueltas helicoidales o aplanadas con una amplitud de hasta 0,5 μm	2-32	25-53	Comensal o parásito de humanos u otros animales	Sífilis Pinta Frambesía Disentería Porcina
Borrelia	8-30 × 0,2-0,5	31	Microaerófilos 5-7 vueltas de 1μm de amplitud	7-20	46	Humanos y otros animales	Fiebre recurrente Lyme
Leptospira	6-20 × 0,1	13	Aerobios. Vueltas apretadas con extremos en forma de gancho. Requieren ácidos grasos de cadena larga	2	33-43	Vida libre o parásitos de humanos. Otros mamíreros	Leptospirosis
Leptonema	6-20 × 0,1	1	Aerobios. No requieren ácidos grasos de cadena larga	2	54	Vida libre	Ninguna
Brachyspira	7-10 × 0,35-0,45	8	Anaerobios	8-28	25-27	Intestino de animales de sangre caliente	Diarreas en pollos y cerdos
Brevinema	4-5 × 0,2-0,3	1	Microaerófilos, forma una rama profunda en el linaje de las espiroquetas, como se deduce de la secuenciación del 16S rRNA (*véase* Figura 12.1)	2	34-36	Sangre y tejidos de ratones	Infecciones en ratones de laboratorio



A. Hyde

Figura 12.97 Micrografía electrónica de transmisión (corte fino) de *Cristispira*, una espiroqueta grande. Diámetro celular de 2 µm. Nótense los abundantes endoflagelos.

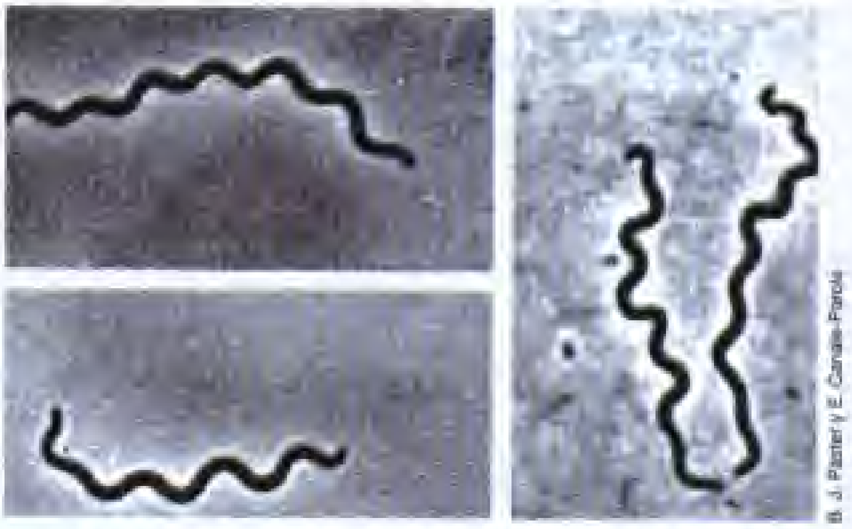
son fácilmente visibles rotando rápidamente en el sentido de las agujas del reloj. Las especies de *Cristispira* se encuentran tanto en moluscos marinos como de agua dulce, pero no todos los moluscos las poseen. Desgraciadamente no son cultivables de momento, por lo que se desconocen las razones fisiológicas del hábitat tan preciso que poseen.

Treponema

Las espiroquetas asociadas a hospedadores humanos o animales que son anaerobias se ubican en el género *Treponema*. El agente causal de la sífilis *T. pallidum* (Sección 26.12) es el mejor conocido. Difiere morfológicamente de las otras espiroquetas en que es una onda aplastada. *T. pallidum* es fino, midiendo unos 0,2 µm de diámetro. Las células vivas pueden verse claramente en el microscopio de campo oscuro o con tinción con anticuerpos fluorescentes; la primera técnica ha sido la más utilizada para el estudio de exudados de lesiones sifilíticas (Figura 26.28). En la naturaleza, el *T. pallidum* está restringido a humanos, aunque se han conseguido infecciones experimentales en conejos y monos. Aunque nunca ha sido posible crecerla en el laboratorio, se ha deducido del estudio de conejos infectados, que contienen el sistema citocrómico y que, de hecho, son microaerofílicas en lugar de anaerobios estrictos. Estas células han dado suficiente DNA como para establecer el programa de secuenciación del genoma (1.14 megabases; Sección 15.3).

Otras especies del género *Treponema* son comunes en la cavidad oral del hombre siendo posible su aislamiento del espacio interdentario y entre la encía y piezas dentarias. Se han descrito tres especies: *T. denticola*, *T. macrodentium* y *T. oralis* que difieren en características morfofisiológicas. *T. denticola* fermenta aminoácidos tales como cisteína y serina originando acetato como principal producto final, así como anhídrido carbónico, amoníaco y ácido sulfídrico. Las espiroquetas también se encuentran en el rumen. *T. saccharophilum* (Figura 12.98) es una gran espiroqueta pectinolítica que se aísla del rumen del ganado bovino; es anaerobio estricto y fermenta la pectina, inulina y otros polisacáridos de plantas. Ésta y otras espiroquetas deben jugar un papel muy importante en la conversión del material vegetal en ácidos grasos volátiles, utilizables como fuente de energía por los rumiantes (Sección 19.11).

Aunque el género *Treponema* es una unidad filogenética, la relación verdadera entre *T. pallidum* y otras especies de *Treponema* puede ser bastante distantes, pues el índice GC de *T. pallidum* es del 53%, mientras que el resto de las especies del género se apiñan en torno a 38-40% o 25-26%.



B. J. Paster y E. Canale-Parola

Figura 12.98 Micrografía de contraste de fases de *Treponema saccharophilum*, una gran espiroqueta pectinolítica del rumen bovino. Diámetro celular de 0,4 µm. Izquierda, células regularmente enroscadas; derecha, irregularmente enroscadas.

Leptospira

El género *Leptospira* y *Leptonema* contienen especies aerobias estrictas, que utilizan ácidos grasos de cadena larga (como por ejemplo el ácido oleico) como donadores de electrones y fuentes de energía. Con pocas excepciones, éstos son los únicos sustratos que utilizan las leptospiras para su crecimiento. La célula es delgada, finamente enrollada y doblada en sus extremos formando ganchos característicos semicirculares. Se reconocen diversas especies, algunas de vida libre y otras parásitas. Las dos más importantes son *L. interrogans* (parásita) y *L. biflexa* (vida libre). El reservorio natural de las leptospiras son los roedores, aunque los cerdos y los perros pueden ser intermediarios idóneos hasta el hombre. En humanos el síndrome más característico es la *leptospirosis*; el organismo se localiza en el riñón y causa fallo renal y muerte.

Las leptospiras entran normalmente a través de las mucosas o pequeñas lesiones en la piel. Después de una reproducción parcial en diversas partes del cuerpo, se asientan finalmente en el riñón e hígado causado respectivamente fallo renal y bilirrubinosis. La contaminación a otros hospedadores suele ser por la orina. Es tratable durante periodos largos para ser eliminada del riñón con penicilina, estreptomicina o tetraciclina. Los animales domésticos como los perros suelen ser vacunados contra la **leptospirosis** con vacunas de cepas virulentas muertas. La lucha en humanos se centra principalmente por la eliminación del patógeno en la cadena de trasmisión: perros y otros animales domésticos.

Borrelia

La mayoría de las especies del género *Borrelia* son patógenos para el hombre u otros animales. *B. recurrentis* es el agente causal de la **fiebre recurrente** y se transmite generalmente a través del piojo. Se caracteriza por una fiebre muy alta y dolor muscular que dura 3-7 días seguido de un periodo de recuperación de 7-9 días. Si no se trata, la fiebre vuelve en dos, tres ciclos adicionales (de aquí el nombre) causando la muerte hasta el 40% de los infectados. Afortunadamente, el microorganismo es bastante sensible a la tetraciclina y si se diagnostica pronto el tratamiento es muy efectivo. Otras borrelias tienen importancia veterinaria, causando enfermedades en vacas, ovejas, caballos y pájaros. La mayoría de las veces se transmite por hemípteros. *B. burgdorferi* es el causante de la enfermedad de *Lyme*, que afecta a humanos y animales. Esta enfermedad se discute en la Sección 27.4. Es interesante porque es el único procariota junto con *Streptomyces* con el cromosoma linear en vez de circular. Su pequeño genoma (1.44 megabases) ya ha sido completamente secuenciado (Sección 15.3).

✓ 12.33 Revisión de conceptos

Las espiroquetas tienen forma de muelle, son móviles y contienen formas de vida libre o patógenas.

- ✓ ¿Cómo se compara el endoflagelo de las espiroquetas con los flagelos de *Escherichia coli*?
- ✓ Nombre dos enfermedades humanas causadas por espiroquetas
- ✓ ¿Cuál es el hábitat habitual de *Cristispira*?

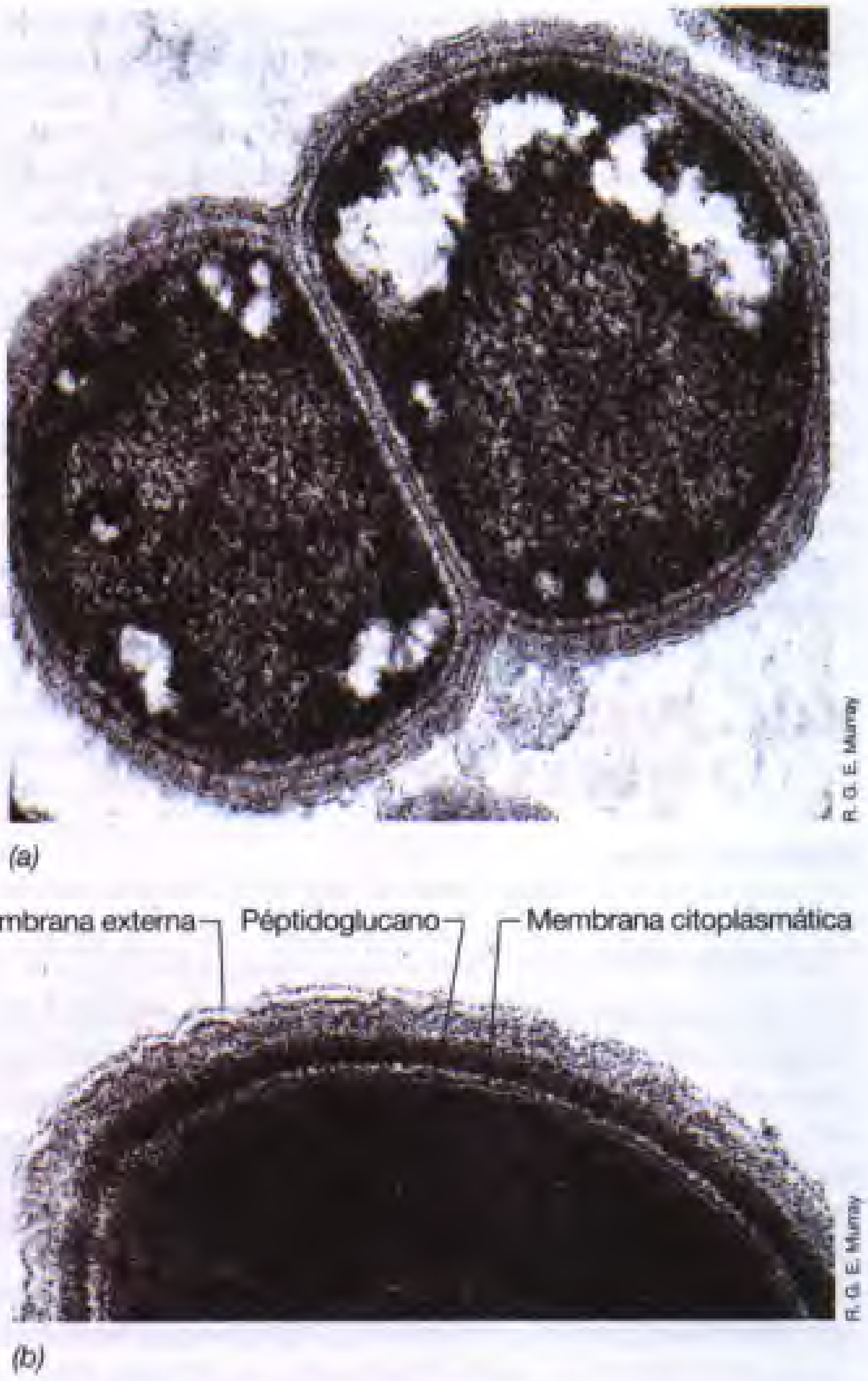


Figura 12.99 *Deinococcus radiodurans*: un coco resistente a la radiación. Diámetro celular de 2,5 µm. (a) Micrografía electrónica de transmisión (corte fino). Nótese la membrana externa. (b) Un detalle a mayor aumento de la pared celular.

XII PHYLUM 11: DEINOCOCOS

12.34 *Deinococcus/Thermus*

Géneros clave

Deinococcus
Thermus

Este phylum contiene tres géneros solamente y los mejores estudiados son *Deinococcus* y *Thermus*. Este último incluye especies termofílicas quimioorganotrofas como es *T. aquaticus*, organismo del que se obtiene la *Taq* DNA polimerasa. Por ser muy termorresistente, la enzima se usa rutinariamente en las reacciones de PCR como se ha discutido en la Sección 10.17. Las especies de *Thermus* son Gram negativas y contienen una rara forma de peptidoglucano con ornitina en lugar de mesodiaminopimélico (Sección 4.8). *Deinococcus* también contiene ornitina. Se han descrito varias especies del género *Thermus* y todas crecen aeróbicamente catabolizando azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos. A continuación se resumen las principales características de *Deinococcus*.

Este género contiene cuatro especies de cocos Gram positivos, siendo *D. radiodurans* (antiguo *Micrococcus radiodurans*) el mejor estudiado. Su pared celular es compleja con varias cepas incluyendo curiosamente una membrana externa (Figura 12.99) como la que se encuentra en Gram negativos (Sección 4.9), pero que, sin embargo, carece de lípidos. Fisiológicamente, *D. radiodurans* es un quimioorganotrofo aeróbico que crece en medios complejos.

Radiación y resistencia

La mayor parte de los deinococos son rojos o rosas debido a la presencia de carotenoides y muchas especies son resistentes a radiaciones ultravioletas y a la desecación. La resistencia a la radiación puede utilizarse con éxito como una forma de enriquecimiento para aislar deinococos de hábitat naturales. Estos sorprendentes organismos se aíslan del suelo, carne picada, polvo y aire filtrado y después de exposición a fuertes dosis de radiación ultravioleta (e incluso gamma) y cultivándolos en un medio rico con triptona y extracto de levadura. Debido a que muchas cepas de *D. radiodurans* son más resistentes a la radiación que las endosporas bacterianas, el tratamiento de una muestra con altas dosis de radiación destruye todas las bacterias, incluso endosporas, excepto el deinococo, con lo que su aislamiento es muy fácil. Por ejemplo, las células de *D. radiodurans* sobreviven la exposición a 30.000 Gy de radiación ionizante (1 Gy = 100 rad), suficiente como para literalmente desintegrar el cromosoma de la bacteria (un humano puede morir tras exposición a menos de 5 Gy). Este microorganismo tiene un sistema de reparación de DNA verdaderamente espectacular y puede reconstruir su cromosoma a partir de cientos de fragmentos. Se han aislado cerca de reactores nucleares y otras fuentes potencialmente letales de radiación.

Además de su impresionante resistencia a la radiación, *Deinococcus radiodurans* resiste los efectos mutagénicos de muchos mutágenos. Los estudios realizados sobre la mutabilidad de *D. radiodurans* han puesto de manifiesto, que es muy eficiente en la separación del DNA dañado. *D. radiodurans* posee diversas enzimas de reparación del DNA que reparan las roturas producidas en el DNA monocatenario o bicatenario, y escinden y reparan los dimeros de timina formados por la acción de la luz ultriavioléta. Los únicos mutágenos químicos que parecen funcionar en *D. radiodurans* son los agentes del tipo de la nitrosoguanidina, que induce *deleciones* en el DNA; dichas deleciones aparentemente son las mutaciones puntuales en este microorganismo, de forma que se pueden aislar mutantes de *D. radiodurans* con este método.

XIII PHYLUM 12: *BACTERIA* VERDES NO DEL AZUFRE

Géneros clave

Chloroflexus
Thermomicrobium

Este phylum de bacterias es filogenéticamente diferente y contiene unos pocos géneros, siendo *Chloroflexus* el mejor conocido. *Thermomicrobium* es un miembro quimiotrófico del grupo y es aerobio estricto, Gram negativo que crece en medios complejos a 75°C. Es también interesante por los lípidos de su membrana. Recuérdese que los lípidos de *Bacteria* y *Eukarya* contienen ácidos grasos esterificados con glicerol (*véanse* Secciones 3.4 y 4.5). Sin embargo en *Thermomicrobium* los lípidos contienen 1,2-dialcoholes en lugar de glicerol y no poseen ni enlaces éster ni éter (Figura 12.100). Tampoco poseen peptidoglucano.

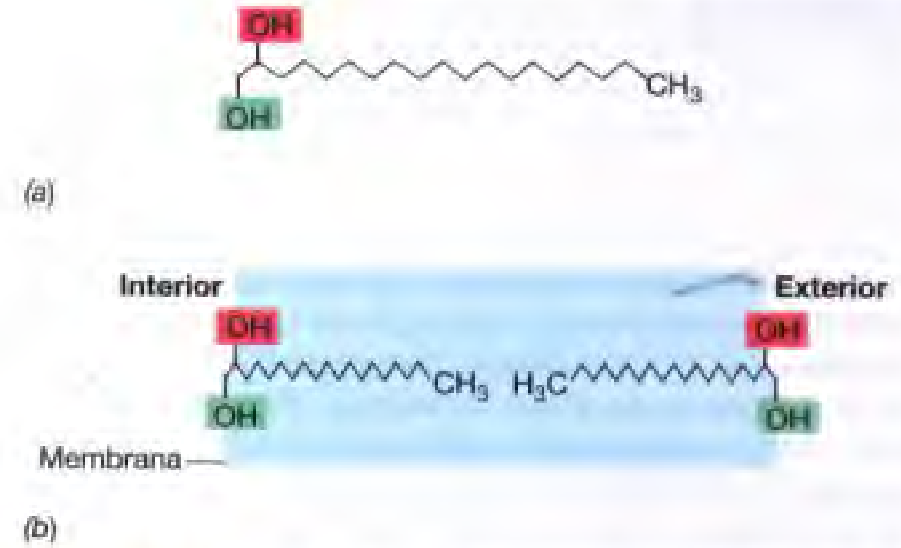


Figura 12.100 Lípidos poco habituales de *Thermomicrobium*. (a) Lípidos de la membrana de *T. roseum* con largas cadenas diólicas como las mostradas aquí (13-metil-1,2 nonadecanodiol). Nótese que al contrario que los lípidos de *Bacteria* o los de *Archaea*, no existen cadenas laterales con enlaces éster o éter (*véase* Sección 4.5). (b) Para formar bicapas, las moléculas de di-alcohol probablemente se oponen una a la otra por los restos metilos y los grupos orientados hacia las superficies hidrofílicas interna y externa. Pequeñas cantidades de los dioles tienen ácidos grasos esterificados con el grupo OH secundario (en rojo) mientras que el grupo OH primario (en verde) puede unirse a una molécula hidrofílica como el fosfato.

12.35 *Chloroflexus* y *Heliothrix*

Chloroflexus y la mayor parte de bacterias verdes no del azufre son procariotas filamentosas que forman matas espesas en manantiales termales de tipo neutro (Figura 12.101; *véase* también Figura 18.18*a*). Organismos semejantes a *Chloroflexus* también se aíslan en ambientes marinos no termales. Aunque son anoxifototrofos, es en realidad un fototrofo «híbrido», en el sentido de que la fotosíntesis recuerda a la de bacterias rojas del azufre y verdes del azufre. Como estas últimas, *Chloroflexus* contiene bacterioclorofila *c* y clorosomas (*véase* Figura 12.92 para una micrografía electrónica de un clorosoma). Sin embargo, la bacterioclorofila *a*, localizada en la membrana citoplasmática de la célula de *Chloroflexus*, se organiza formando un centro de reacción fotoquímica semejante al que se encuentra en las bacterias rojas del azufre (por el contrario, tal centro en las bacterias verdes del azufre es estructuralmente muy diferente, *véase* Figura 17.18). Se ha propuesto que el *Chloroflexus* actual pueda ser un vestigio de una forma de vida fototrófica ancestral, que quizás evolucionó con un centro de reacción fotoquímico primario y más tarde recibió de forma colateral genes cromosomales de fotosíntesis, en una evolución secundaria.

Fisiológicamente, *Chloroflexus* se parece a las bacterias rojas del azufre en el sentido de que la fotoautotrofia puede apoyarse en (H_2S + CO_2) o (H_2 + CO_2). Sin embargo, en *Chloroflexus*, el fototrofismo es idóneo con compuestos orgánicos como fuente de carbono (fotoheterotrofia). También crece bien en la oscuridad como un quimioorganotrofo por respiración aeróbica. Interesantemente y esto debería ser tenido en cuenta bajo un prisma de posición evolutiva que localizaría a *Chloroflexus* como el fototrofo anoxigénico más antiguo (Figura 12.1), la autotrofia en este microorganismo tiene lugar por incorporación de CO_2 a través del ciclo del hidroxipropionato que es exclusivo de este microorganismo (Figura 17.24*b*). (Se considera la bioquímica de esta ruta nueva para el autotrofismo en la Sección 17.7.)

Otras bacterias verdes no del azufre

Además de *Chloroflexus*, otras bacterias verdes no del azufre incluyen al termófilo *Heliothrix*, al mesófilo *Oscillochloris* (Figura 12.101*b*) y a *Chloronema* (Figura 12.101*c*). *Heliothrix* tiene interés porque es filogenéticamente y fenotípicamente muy semejante a *Chloroflexus*, excepto en que carece de bacterioclorofila *c* y clorosomas. *Oscillochloris* y *Chloronema* son inusuales porque son bastante grandes (2-5 μm de ancho y varios cientos de largo) (Figura 12.101*c*). Ambos microorganismos se desarrollan en lagos de agua dulce que contengan bajos niveles de ácido sulfídrico, junto con otras especies de bacterias rojas del azufre.

✓ 12.34-12.35 Revisión de conceptos

Deinococcus y *Chloroflexus* son cada uno géneros clave en linajes separados de bacterias. *D. radiodurans* es la forma biológica más resistente a las radiaciones y *Chloroflexus* es un anoxifototrofo

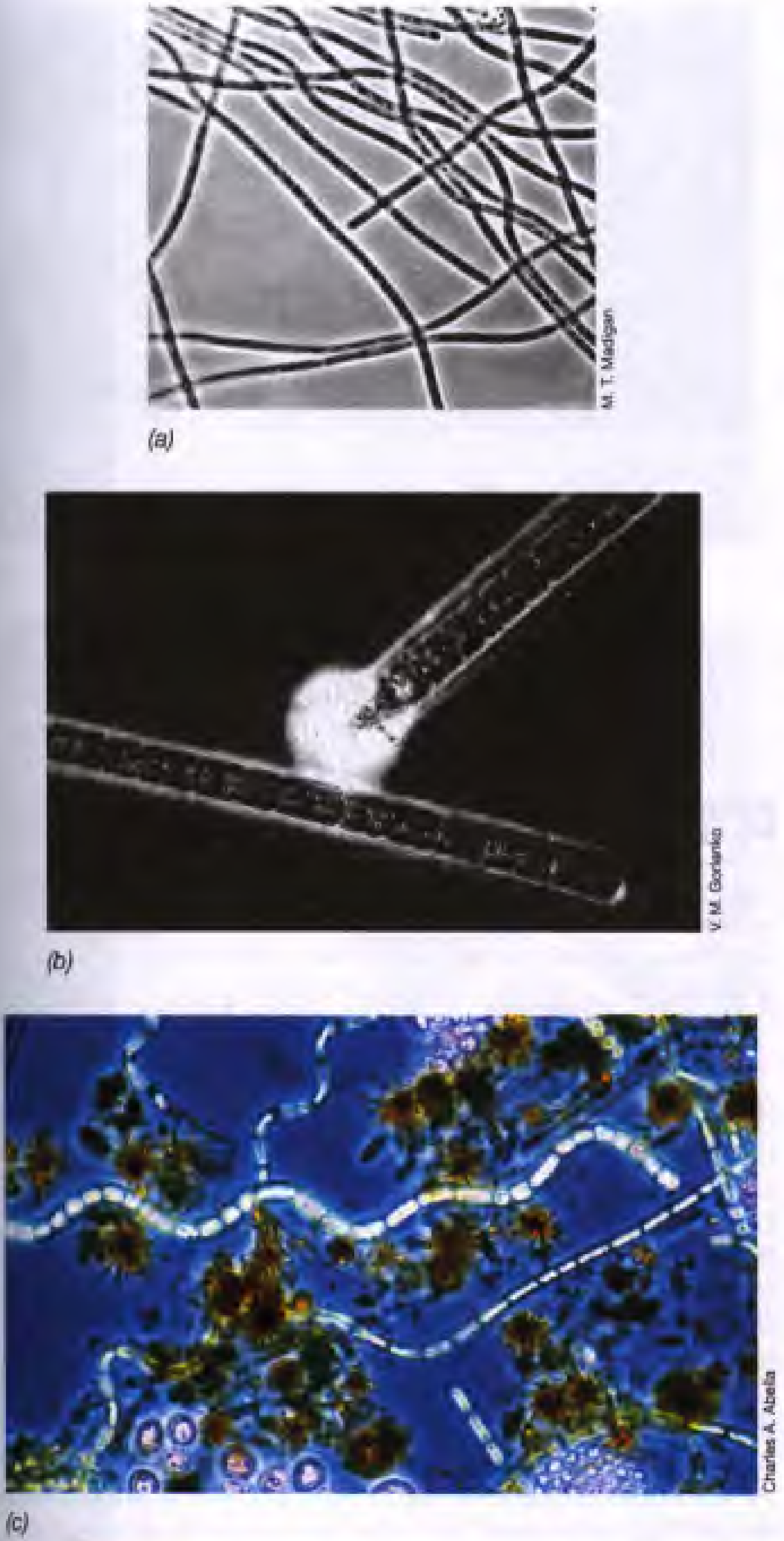


Figura 12.101 Bacterias verdes no del azufre. (a) Micrografía de contraste de fases del fototrofo termofílico *Chloroflexus aurantiacus*. Diámetro celular de 1 μm. (b) Micrografía de contraste de fases del fototrofo grande *Oscillochloris*. Diámetro celular de 5 μm. El material más brillante es un punto para fijación a superficies. (c) Filamentos de *Chloronema* creciendo en un lago estratificado de Michigan. Estas células de *Chloronema* son filamentos ondulados de diámetro 2,5 μm. A pesar de haberse clasificado como bacterias «no del azufre» estas especies son capaces de oxidar H_2S como donador de electrones fotosintético. Además, *Chloroflexus* puede crecer quimiorganotróficamente en la oscuridad por respiración aeróbica.

que comparte características de las bacterias rojas del azufre y de las verdes del azufre.

- ✓ ¿Cómo evita la muerte *D. radiodurans* a altas dosis de radiación?
- ✓ ¿En qué se parece *Chloroflexus* a un organismo como *Chlorobium*, y a un organismo como *Rhodobacter?*
- ✓ ¿Qué es único de *Thermomicrobium?*

XIV PHYLA 13 Y 14: *BACTERIA* HIPERTERMÓFILAS MUY RAMIFICADAS

Géneros clave

Thermotoga
Thermodesulfobacterium
Aquifex
Thermocrinus

Estos tres últimos phylum de bacterias se agrupan en torno a la hipotética raíz (Figuras 11.13 y 12.1). Cada reino consiste de uno o dos géneros principales y una característica fisiológica clave, como es su *hipertermofilia*, esto es, capacidad para crecer a temperaturas superiores a 80°C (Sección 6.10).

12.36 *Thermotoga y Thermodesulfobacterium*

Thermotoga es un hipertermófilo bacilar capaz de crecer a 90°C (óptimo 80°C), contienen una vaina o «*toga*» (Figura 12.102*a*), son Gram negativos y no esporulados. *Thermotoga* es anaerobio, quimioorganotrofo y posee metabolismo fermentativo que cataboliza azúcares y polímeros tales como el almidón hasta lactato, acetato, CO_2 e H_2 como productos principales de la fermentación. Se han aislado de hábitat terrestres, manantiales calientes y fuentes calientes submarinas.

Thermodesulfobaterium

Thermodesulfobacterium (Figura 12.103*a*) es una bacteria termofílica reductora de sulfato que se ubica entre *Thermotoga* y *Aquifex* (Figura 12.1). Aunque no es un verdadero hipertermófilo, pues crece con temperatura óptima de 70°C, es sin duda el más termófilo de todas las bacterias reductoras de sulfato (la reductora de sulfato de las arqueas *Archaeoglobus* es un verdadero hipertermófilo (Sección 13.7). Como otros sulfato reductores del grupo I (Sección 12.18), *Thermodesulfobacterium* es un anaerobio estricto, no puede utilizar el acetato como donador de electrones sino que utiliza compuestos como el lactato, piruvato y etanol para reducir el sulfato hasta sulfídrico.

Poseen lípidos con enlaces éter (recuérdese que este carácter es típico de arqueas y que una cadena poliisoprenoídica de C_{20} (fitanilo) remplaza a los ácidos grasos; Secciones 4.5 y 11.8). En el caso de *Thermodesulfobacterium* en lugar de fitanilo poseen un C_{17} exclusivo junto algunos ácidos grasos (Figura 12.103*b*); es decir *Thermodesulfobacterium* combina caracterís-

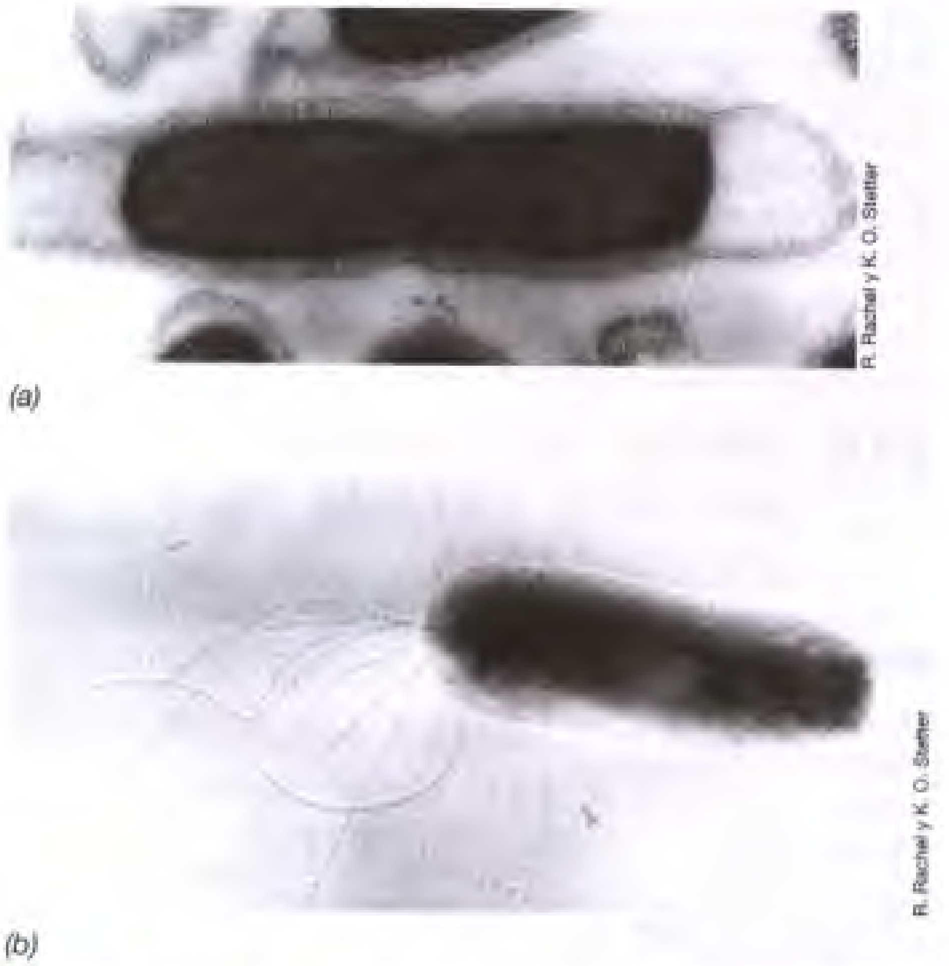


Figura 12.102 *Bacteria* hipertermofílicas. (a) *Thermotoga maritima*- temperatura óptima de 80°C. Nótese la cubierta externa celular (la toga). (b) *Aquifex pyrophilus*- temperatura óptima de 85°C. Las células de *Thermotoga* (corte fino) miden 0,6 × 3.5 µm; las células de *Aquifex* (criofractura) miden 0,5 × 2,5 µm. Ambos forman sus propios linajes filogenéticos dentro de la rama *Bacteria* (*véase* Figura 12.1).

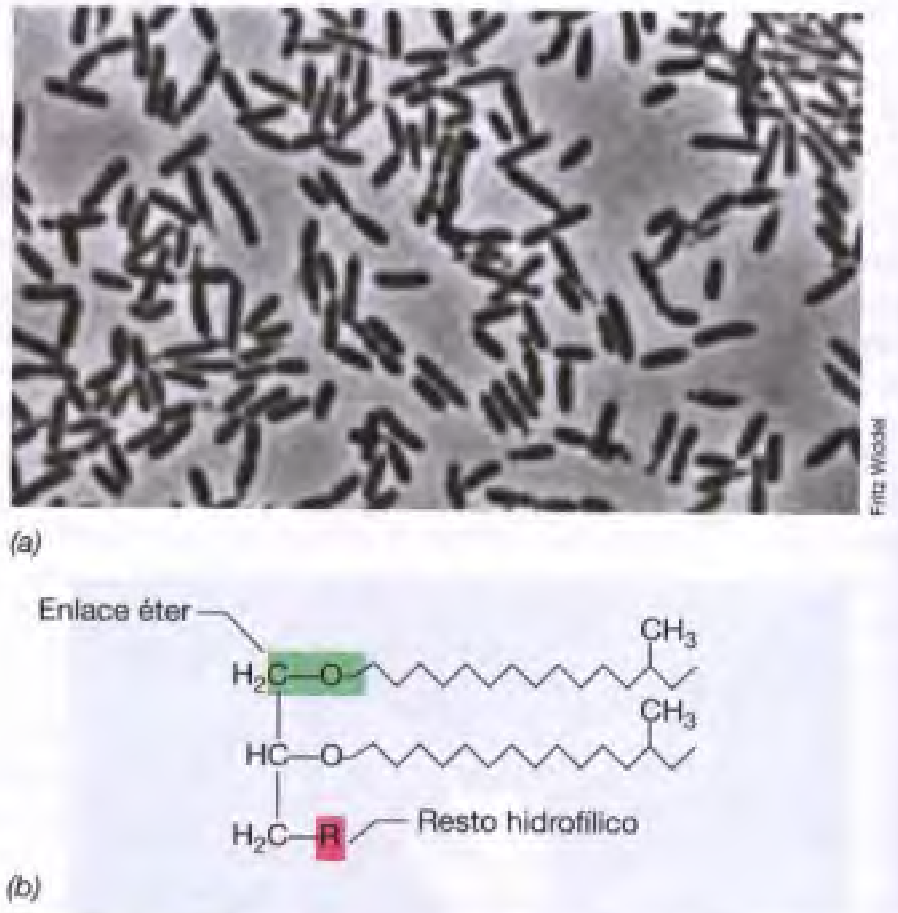


Figura 12.103 *Thermodesulfobacterium*. (a) Micrografía de contraste de fases de *T. mobile*. (b) Estructura de uno de los lípidos de *T. mobile*. Nótese que aunque los enlaces son éter, las dos cadenas laterales hidrofóbicas no son unidades de fitanil como en *Archaea* (Sección 4.5). La letra «R» es para indicar restos hidrofílicos tales como un grupo fosfato.

ticas de *Bacteria* y de *Archaea*. Sin embargo la bacteria *Ammonifex*, un miembro termofílico de Gram positivas con bajo contenido en GC que crece anaeróbicamente por oxidación de H_2 acoplada a la reducción de nitrato hasta amoníaco también contiene lípidos, como los de *Thermodesulfobacterium*, por ello se piensa que los lípidos con enlaces éter deben ser más frecuentes de los que en principio se pensó.

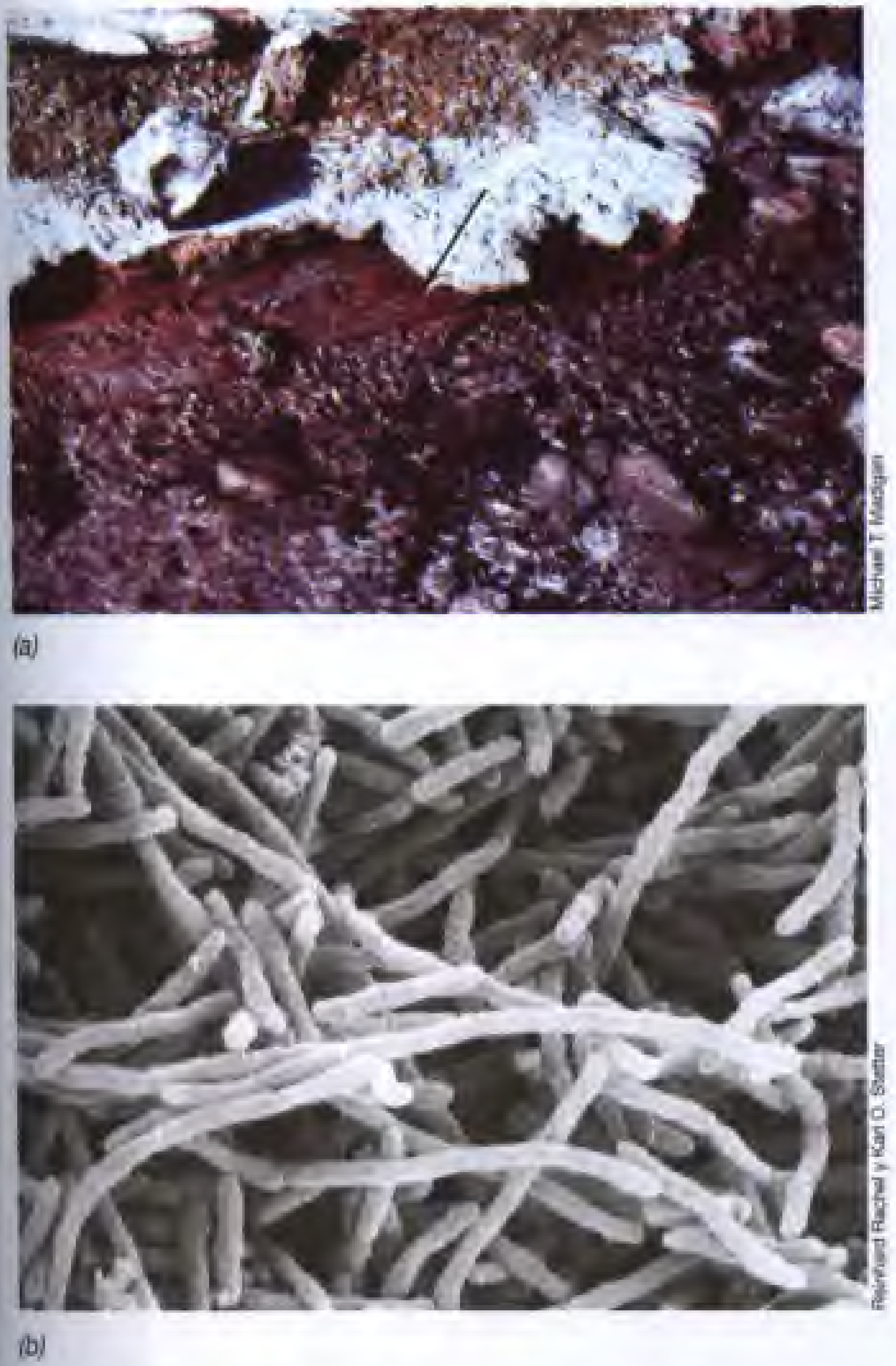
12.37 *Aquifex, Thermocrinus* y géneros relacionados

El género *Aquifex* (Figura 12.102*b*) es quimiolitotrofo estricto e hipertermófilo autotrófico, siendo de hecho el más hipertermófilo de *Bacteria*. Varios *Aquifex* utilizan H_2, S^0, o $S_2O_3^{2-}$ como donadores de electrones y O_2 o NO_3^- como aceptores y crecen bien con temperaturas altas de hasta 95°C (óptimo 85°C). Soporta bajas tensiones de oxígeno y es uno de los pocos restos aeróbicos de entre los hipertermófilos junto con unas pocas *Archaea* (*véase* Secciones 13.5 y 13.9). Son completamente incapaces de crecer quimioorganotróficamente sobre compuestos orgánicos, incluyendo mezclas complejas de extractos de levadura o de carne. *Hydrogenobacter* un pariente próximo de *Aquifex*, muestra muchas propiedades semejantes, pero es un aerobio estricto.

La autotrofia en *Aquifex* se lleva a cabo mediante enzimas del ciclo del ácido cítrico reverso, y una serie de reacciones que consisten en que anteriormente sólo se habían observado en las bacterias valores del azufre (*véanse* Secciones 12.32 y 17.7) en el dominio *Bacteria*. Se ha secuenciado completamente el genoma de *Aquifex aeolicus* (*véase* Sección 15.3) y todo su metabolismo quimiolitrófico/autotrófico está codificado en un genoma sorprendentemente pequeño de tan sólo 1,55 megabases (lo que equivale a un tercio del genoma de *E. coli*). Este hecho ya se comentó previamente en la Sección 11.2, cuando se trató de las propiedades fisiológicas de las formas de vida primitivas. El hallazgo de que tantos hipertermófilos, especies tanto de *Archea* como de *Bacteria* como *Aquifex*, sean quimiolitotrofos del H_2, junto con el hecho de que se ramifican muy pronto (divergen) como linajes en sus respectivos árboles filogéneticos (*véanse* Figuras 11.13, 12.1 y 13.1), sugiere que el H_2 fue un donador de electrones clave para los organismos en las condiciones de la Tierra primigenia. En la Figura 11.5 se muestra un modelo simple de la utilización del H_2 para generar una fuerza motriz de protones y, como consecuencia, producir energía en forma de ATP.

Thermocrinus

Un pariente interesante de *Aquifex* y de *Hydrogenobacter* es *Thermocrinus* (Figura 12.104*a*). Este microorganismo es hipertermofílico (temperatura óptima de 80°C), quimiolitotrofo capaz de oxidar el hidrógeno, tiosulfato o azufre elemental siendo el oxígeno el aceptor de electrones. *Thermocrinus ruber*, la única especie conocida, crece en ma-



Michael T. Madigan

Reinhard Rachel y Karl O. Stetter

Figura 12.104 *Thermocrinus*. (a) Células de *Thermocrinus ruber* creciendo como masas filamentosas (flecha) sobre un sustrato silíceo en el Manantial del Pulpo, (85°C) Parque Nacional de Yellowstone. El color rosa es debido a un pigmento carotenoide. (b) Micrografía electrónica de barrido de bacilos de *T. ruber* creciendo sobre vidrio cubierto de silicona. Las estructuras semejantes a cabellos son fibras de silicona. Tamaño celular: 0,4 × 1-3 µm.

nantiales calientes de Parque Nacional de Yellowstone, formando arroyos rosas formados de masas filamentosas de células de este microorganismo y adheridas a un sustrato silíceo (Figura 12.104*a*). En cultivos estáticos crece como células individuales en forma de bacilo (Figura 12-104*b*). No obstante, cuando se cultiva en un sistema fluido en el que el medio de cultivo se deja gotear cuidadosamente sobre una superficie de cristal (como un portaobjetos) a la que las células puedan adherirse, *Termocrinus* adopta la forma filamentosa.

Thermocrinus ruber tiene un gran significado histórico para cualquier microbiólogo actual, pues fue uno de los primeros microorganismos termófilos estudiados por Thomas Brock, en los años 1960, pionero en el campo de la biologia de las aguas termales. El descubrimiento por Brock de que estos arroyos rosas (Figura 12.104*a*) contenían ácido nucleico y proteínas, indicaba claramente que poseían seres vivos y que no eran meramente depósitos inorgánicos. Además, la presencia de corrientes en el flujo de las fuentes termales a 80-90°C y no a temperaturas más bajas, apoyaba la hipótesis de Brock de que se trataba de *microorganismos termófilos estrictos*, y que, probablemente, podrían estar presentes incluso en agua hirviendo. Esto fue en años siguientes perfectamente corroborado, con el descubrimiento de docenas de géneros de procariotas hipertermófilos que viven en fuentes termales, fuentes hidrotermales submarinas y otros ambientes a altas temperaturas (Secciones 6.10, 12.37 y 12.38, 13.4-13.10 y 19.8).

XV PHYLA 15 Y 16: *NITROSPIRA* Y *DEFFERIBACTER*

12.38 *Nitrospira, Defferibacter* y géneros relacionados

Aunque hemos cubierto un gran número de phyla de *Bacteria*, algunos otros se han descrito por secuencia directa de RNA y de ellos se conoce poco. Tal es el caso de *Nitrospira* y *Defferibacter* (Figura 12.1). Fisiológicamente, estos dos organismos son o bien quimiolitotrofos o quimioorganotrofos y son desde mesófilos hasta termófilos.

Como las proteobacterias nitrificantes (*véase* Sección 12.3), *Nitrospira* oxida nitroso hasta nítrico y crece autotróficamente. A pesar de su relación con las bacterias clásicas nitrificantes, *Nitrospira* es filogenéticamente muy diferente y además carece de un sistema desarrollado de membranas internas, como es el caso de las bacterias nitrificantes (*véase* Figuras 12.7 y 12.8). Sin embargo, comparte econichos con ellas; por ello se ha sugerido que la capacidad de nitrificación se adquirió de forma colateral durante la evolución del género y a partir de las bacterias nitrificantes; esta estrategia de evolución lateral ha sido muy frecuentemente explotada por el mundo procariótico (Sección 11.7).

Otros géneros en el grupo de *Nitrospira* incluyen *Leptospirillum*, un quimiolitotrofo oxidante de hierro, responsable de gran parte del drenaje ácido de las minas de carbón y hierro (Sección 19.16) y también incluye *Thermodesulfovibrio*, una bacteria reductora de sulfato y termofílica que habita manantiales de agua caliente (Sección 18.10)

Defferibacter

El género *Defferibacter* también forma su linaje distintivo (Figura 12.1) e incluye especies anaerobias. Otros géneros en el grupo incluyen *Geovibrio* y *Flexistipes*, siendo éste último anaerobio estricto y metabolismo fermentador. *Defferibacter* y *Geovibrio* muestran, sin embargo, una respiración anaeróbica muy versátil, utilizando bastantes aceptores de electrones que incluyen los iones férrico y manganoso. Vimos en el Capítulo 17, cómo la respiración anaerobia puede utilizar diversos aceptores finales de electrones. Los miembros del grupo *Defferibacter* son poco habituales en cuanto al gran número de aceptores de electrones alternativos que pueden usar y porque son anaerobios estrictos. La mayoría de los microrganismos capaces de crecer por respiración anerόbica con nitrato o metales como aceptores de electrones son anaerobios facultativos, es decir, son capaces de crecer bien en aerobiosis total (respiración aeróbica) o bien por respiración anaeróbica (*véase* Sección 17.13).

✓ 12.36-12.38 Revisión de conceptos

Thermotoga, *Thermodesulfobacterium* y *Aquifex* crecen a altas temperaturas y cada uno de ellos constituye una punta de lanza evolutiva de linajes principales de *Bacteria*. *Aquifex* es un quimiolitotrofo que oxida hidrógeno, mientras que *Thermotoga* y *Thermodesulfobacterium* son quimioorganotrofos anaeróbicos. *Nitrospira* y *Deferribacter* forman sus propios campos evolutivos.

- ✓ Compare el metabolismo catabólico de *Thermotoga* y *Thermodesulfobacterium*.
- ✓ ¿Qué es inusual de los lípidos de *Thermodesulfobacterium*?
- ✓ Desde una perspectiva genómica, ¿por qué es sorprendente que *Aquifex* sea capaz de crecer a partir de anhídrido carbónico, hidrógeno y oxígeno?
- ✓ Contraste las características metabólicas de *Nitrospira* y *Deferribacter*

Preguntas de repaso

1. De todos los Filos de *Bacteria* estudiados en este Capítulo, ¿cuál contiene los grupos con las fisiologías más diversas?
2. Indique ejemplos de cómo la reacción del Gram posee valor predictivo en estudios filogenéticos?
3. ¿Qué tienen en común las cianobacterias con los proclorofitos? ¿Y con los cloroplastos? ¿Cómo se piensa que están relacionados filogenéticamente?
4. ¿Qué comparten en común las especies de *Plantomyces* con representantes de *Archaea*?
5. ¿En qué se parecen *Chlorobium* y *Chloroflexus*?¿En qué difieren?
6. Indique una característica fisiológica clave de los siguientes representantes de *Bacteria* que la separaría inequívocamente una de otra: *Acetobacter, Methanococcus, Azotobacter, Desulfovibrio, Lactobacillus, Nitrobacter, Oscillatoria*.
7. Indique una característica morfológica clave que diferenciaría los siguientes representantes de *Bacteria*: *Streptococcus, Spirillum, Streptomyces, Verrucomicrobium* y *Spirochaeta*.
8. ¿Qué características clave podrían usarse para diferenciar los siguientes géneros de bacterias Gram positivas: *Bacillus, Mycoplasma* y *Mycobacterium*?
9. ¿En qué se parecen y en qué se diferencian las clamidias y las riquetsias?
10. ¿Qué características fisiológicas importantes unen a las especies de *Thermotoga, Aquifex* y *Thermocrinus*?
11. Compare y diferencie entre el metabolismo, la morfología y la filogenia de las bacterias rojas no del azufre y las bacterias verdes no del azufre.
12. Haga una lista del donador de electrones para el metabolismo energético de cada uno de los siguientes géneros de *Bacteria* y diga si el microorganismo es aerobio o anaerobio: *Thiobacillus, Nitrosomonas, Ralstonia eutrophus, Methylomonas, Acetobacter, Gallionella* y *Propionibacterium*.

Ejercicios prácticos

1. Defienda la siguiente afirmación utilizando argumentos filogenéticos, estructurales y fisiológicos: «*Escherichia coli* es una bacteria mucho más evolucionada que *Thermodesulfobacterium*».
2. Defienda o refute la siguiente afirmación: «La morfología celular no tiene, en absoluto, valor predictivo filogenético».

Aunque algunas especies de *Archaea* se desarrollan en ambientes bastante inocuos, tales como el intestino de animales de sangre caliente, son los ambientes extremos en donde las *Archaea* se desarrollan. Aquí se muestra el crecimiento de una *Archaea* alcalofílica que ha colonizado un lago carbonatado en Egipto. El color rojo es debido a pigmentos carotenoídicos que producen estos organismos para protegerse de los efectos deletéreos de la luz solar. Los haloalcalófilos son procariotas extremófilos que han evolucionado para crecer óptimamente bajo condiciones de alta salinidad y de alto pH.

13

LA DIVERSIDAD PROCARIÓTICA: *ARCHAEA*

I FILOGENIA Y METABOLISMO GENERAL 442
13.1 Visión filogenética de *Archaea* 442
13.2 Conservación de la energía y autotrofía en *Archaea* 443
II PHYLUM EURYARCHAEOTA 444
13.3 Halófilos extremos 444
13.4 *Archaea* productoras de metano: metanógenos 448
13.5 Thermoplasmatales: *Thermoplasma*, *Ferroplasma*, y *Picrophilus* 451
13.6 Euryarchaeota hipertermófilos: Thermococcales y *Methanopyrus* 454
13.7 Euryarchaeota hipertermófilos: Los Archaeglobales 455
III PHYLUM CRENARCHAEOTA 456
13.8 Hábitat y metabolismo energético de los Crenarchaeotas 456
13.9 Hipertermófilos de hábitat terrestres volcánicos: Sulfolobales y Thermoproteales 458
13.10 Hipertermófilos de hábitat volcánicos submarinos: Desulfurococcales 460
IV EVOLUCIÓN Y VIDA A ALTAS TEMPERATURAS 464
13.11 Estabilidad térmica de las biomoléculas 464
13.12 *Archaea* hipertermófilos y evolución microbiana 465

Glosario

Acetotrófico consumidor de acetato. Se usa para describir un metanógeno, organismo capaz de escindir la molécula de acetato en CH_4 y CO_2

Bacteriorrodopsina proteína de membrana que contiene retinal, producida por ciertos halófilos extremos y capaz de generar una fuerza motriz de protones mediante energía lumínica

Crenarchaeota un phylum de *Archaea* que contiene microorganismos hipertermófilos y psicrófilos

DNA girasa reversa proteína universalmente presente en los hipertermófilos que introduce enrollamientos positivos en el DNA circular

Euryarchaeota un phylum de *Archaea* que comprende microorganismos metanogénicos principalmente, halófilos extremos y el género *Thermoplasma*

Fitanil cadena hidrocarbonada de 20 átomos de carbono, ramificada y presente en los lípidos de *Archaea*

Halófilo extremo organismo cuyo crecimiento depende de altas concentraciones de cloruro sódico (generalmente mayor de 10%)

Halorrodopsina bomba de cloro impulsada por la luz que acumula el ion cloruro en el citoplasma

Hipertermófilo procariota con una temperatura de crecimiento óptima de 80°C o superior

«Korarchaeota» un phylum de *Archaea* hipertermófilos que se ramificó en la base del tronco *Archaea*

Metanógeno término que alude a un procariota productor de gas metano

Ruta del acetil-coA (Ljungdahl-Wood) ruta de fijación autotrófica del CO_2 muy extendida entre anaerobios estrictos tal como los metanógenos, homoacetógenos y bacterias reductoras de sulfato

Solutos compatibles sustancias orgánicas o inorgánicas acumuladas en el citoplasma de organismos halófilos para mantener la osmolaridad

Sulfatara emisor volcánico rico en azufre que genera un ambiente ácido y habitado por arqueas hipertermófilas

Termosoma una chaperonina inducida por choque térmico que repliega parcialmente proteínas parcialmente desnaturalizadas por la temperatura en *Archaea* hipertermófilos

I FILOGENIA Y METABOLISMO GENERAL

A continuación consideraremos el dominio *Archaea*. En el capítulo 11 poníamos de relieve las profundas diferencias fenotípicas y filogenéticas que separan *Bacteria* de *Archaea*. Ahora estudiaremos los microorganismos en sí mismos. Algunas características principales (descritas en la Tabla 11.3) incluyen la ausencia de peptidoglicano en las paredes celulares y la presencia de lípidos con enlaces éter y RNA polimerasas muy complejas. Como veremos en este capítulo, a pesar de estas características, el dominio *Archaea* forma un grupo muy diverso desde el punto de vista fenotípico. Como se hizo en el Capítulo 12 sobre el dominio *Bacteria*, aquí también se comienza con una visión filogenética que muestra las relaciones evolutivas dentro del dominio *Archaea*.

13.1 Visión filogenética de *Archaea*

La Figura 13.1 muestra el árbol filogenético de *Archaea* que se bifurca en dos grandes phyla denominados **Crenarchaeota** y **Euryarchaeota**. El tercer phylum **«Korarchaeota»** se ramifica muy tempranamente en la base del árbol filogenético (Figura 13.1). El primer phylum agrupa fundamentalmente especies hipertermófilas tales como las especies que crecen a las mayores temperaturas conocidas. Muchas de estas especies son quimiolitoautotrofos y como sus hábitat respectivos carecen de vida fotosintética los Crenarchaeota son los productores primarios.

Estos microorganismos tienden a agruparse y a ocupar ramas muy cortas en el árbol de la vida basado en el rRNA de 16S (Figuras 11.13 y 13.1). Esto sugiere que estos organismos poseen «relojes evolutivos lentos» y que han sido los últimos en haber evolucionado a partir de ese hipotético antecesor, evolutivo común. Por esta razón son buenos modelos para estudiar formas de vida primitiva sobre la Tierra. Por el contrario, las formas sicrofílicas dentro de este phylum se han detectado por muestreo comunitario (*véanse* Secciones 18.5 y 19.6) de aguas oceánicas y, desde una perspectiva filogenética, evolucionan muy rápidamente por lo que ocupan ramas más largas en el árbol evolutivo (Figura 13.1). Consideraremos los Crenarchaeota más detalladamente en las Secciones 13.8-13.10.

Los Euryarchaeota comprenden un grupo diverso de *Archaea* muchos de los cuales, como en el caso anterior, habitan en ambientes extremos. Aquí veremos las bacterias metanogénicas que estan ligadas a las halobacterias (Figura 13.1). Curiosamente, las primeras son anaerobios estrictos y las segundas aerobias, en su mayor parte. También se incluyen aquí los hipertermófilos *Thermococcus* y *Pyrococcus* y el metanógeno *Methanopyrus* (Figura 13.1), así como, *Thermoplasma* carente de pared celular, un organismo fenotípicamente similar a los micoplasmas (*véase* Sección 12.22). Finalmente, hay que indicar que existe un gran grupo de euryarchaeotas no cultivables de origen marino, que se ubican al final de las ramas y en lo alto del árbol evolutivo (Figura 13.1). En las Secciones 13.3-13.7, se desarrollarán más detenidamente las Euryarchaeota.

Los «Korarchaeota» se descubrieron accidentalmente muestreando comunidades microbianas (*véanse* Secciones 11.6 y 18.5) en un manantial caliente poco habitual de Yellowstone pero ya se pueden cultivar en el laboratorio (*véase* Sección 13.12 y Figura 13.24). El «Korarchaeota», grupo que aún no ha sido reconocido oficialmente en taxonomía, se ramifica en el árbol de arqueas cerca de la base del mismo; y por esta razón sus propiedades biológicas pueden revelar interesantes características de los organismos antiguos.

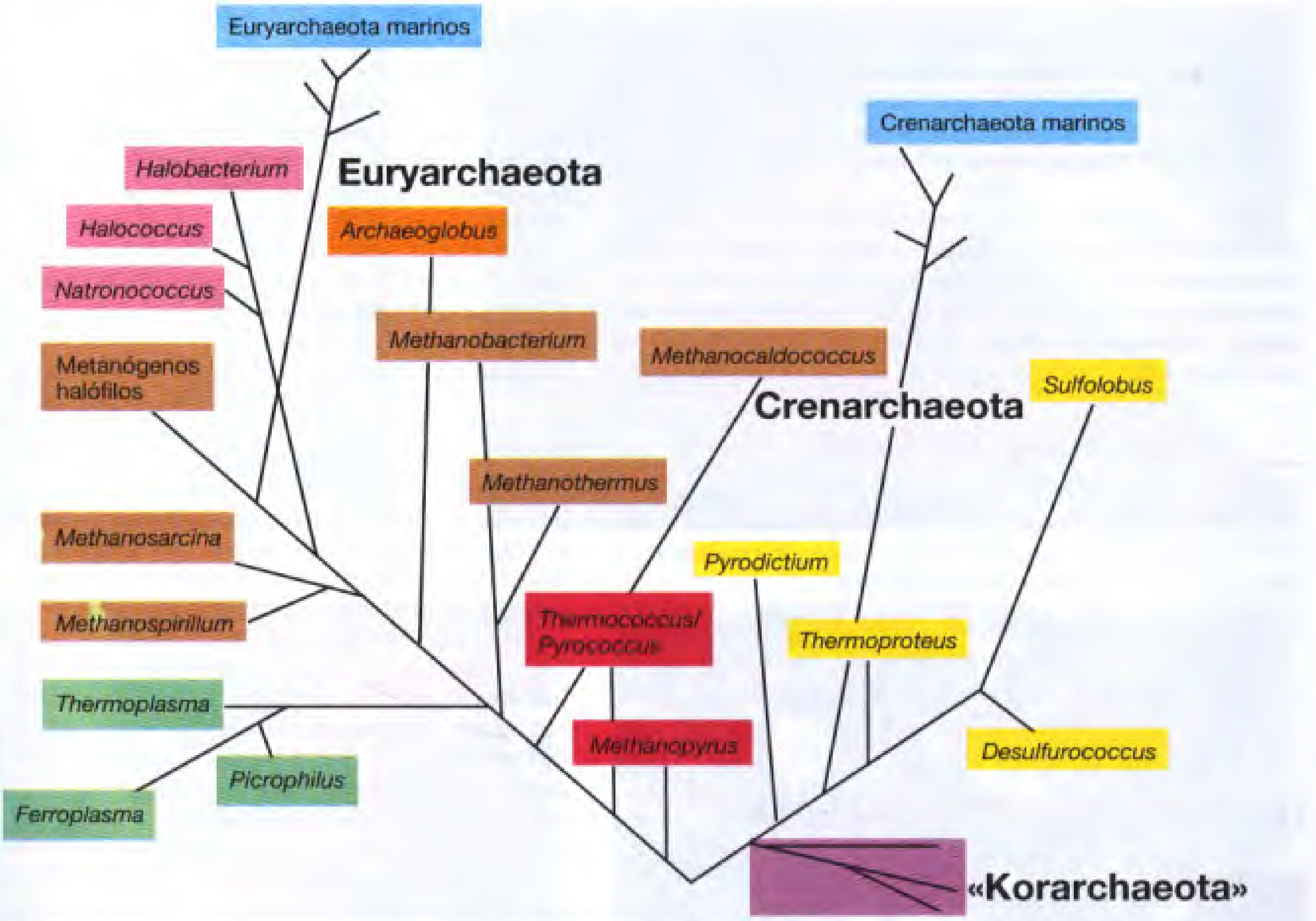

Euryarchaeota marinos
Crenarchaeota marinos
Halobacterium
Euryarchaeota
Halococcus
Archaeoglobus
Natronococcus
Methanobacterium
Methanocaldococcus
Metanógenos halófilos
Sulfolobus
Crenarchaeota
Methanothermus
Methanosarcina
Pyrodictium
Methanospirillum
Thermococcus/ Pyrococcus
Thermoproteus
Thermoplasma
Methanopyrus
Desulfurococcus
Picrophilus
Ferroplasma
«Korarchaeota»

Figura 13.1 Árbol filogenético detallado de *Archaea* basado en la secuencia del rRNA de 16S. Las formas marinas de Euryarchaeota y Crenarchaeota solamente se conocen en comunidades microbianas (*véanse* Secciones 11.6, 18.4 y 18.5).

Con esta visión general de la filogenia de *Archaea*, procederemos a describir brevemente las características metabólicas de *Archaea* y, a continuación, las principales propiedades de las arqueas que han podido cultivarse.

13.2 Conservación de la energía y autotrofia en *Archaea*

El metabolismo energético en los metanógenos no se parece en nada al de otras bacterias pertenezcan a *Bacteria* o *Archaea*. Por esta razón reservamos la discusión de esa parte para el Capítulo 17 y aquí nos centraremos en el metabolismo de *Archaea* no metanógenos.

Algunos son quimioorganotrofos y, por tanto, utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. El catabolismo de la glucosa se produce mediante la ruta de Entner-Doudoroff (E-D) ligeramente modificada (*véase* Sección 12.7) o por la ruta glucolítica (*véase* Sección 5.10). La oxidación de acetato hasta CO_2 ocurre a través del ciclo del ácido cítrico (*véase* Sección 5.13) o de ligeras variaciones así como, la ruta del acetil-coA (*véanse* Sección 17.16). Se conoce poco sobre la síntesis de aminoácidos y otros precursores de macromoléculas en *Archaea* pero, presumiblemente, los monómeros clave se producen a partir de intermediarios biosintéticos, como los previamente indicados para *Bacteria* (*véase* Sección 5.15).

Las cadenas de transporte de electrones tal como los citocromos *a*, *b* y *c*, se encuentran en algunas *Archaea*. Empleando estos transportadores de electrones, el quimioorganotrofismo se produce mediante la introducción de electrones a partir de donadores orgánicos directamente en la cadena transportadora, lo que conlleva a la reducción de O_2, S^0 u otros aceptores electrónicos y a la generación concomitante de una fuerza motriz de protones que origina ATP en ATPasas de membrana (*véase* Sección 5.12). La quimiolitotrofia también está bien establecida en *Archaea*, siendo el H_2 el principal donador de electrones. Más adelante se examinará la quimiolitotrofia e hipertermofilia (Sección 13.8).

La autotrofia está bastante extendida en *Archaea*. En los metanógenos y presumiblemente en la mayoría de los quimiolitotrofos hipertermófilos, el CO_2 se incorpora vía acetil-coA (*véase* Sección 17.16). En otros hipertermófilos, la fijación de CO_2 se lleva a cabo a través del ciclo reverso del ácido cítrico como ocurría en las bacterias verdes del azufre (*véanse* Secciones 12.33 y 17.7) o a través del ciclo de

Calvin, que es el ciclo habitual para la autotrofia tanto en *Bacteria* como en *Eukaryota* (*véase* Sección 17.6). En este sentido, se han caracterizado los genes que codifican (entre otras) la proteína RubisCO termoestable y funcional (cataliza la primera reacción del ciclo de Calvin) a partir del metanógeno *Metanocaldococcus jannaschii* y de especies de *Pyrococcus*.

Vemos, por tanto, cómo muchas de las rutas anabólicas y catabólicas presentes en *Archaea* son semejantes a las vistas en *Bacteria* poniendo de manifiesto que el metabolismo tiene una larga historia evolutiva. Una vez vistos estos aspectos, comenzamos ahora el estudio de la diversidad de este interesante dominio.

✓ 13.1-13.2 Revisión de conceptos

Archaea posee tres trayectorias filogenéticas, Euryarchaeota, Crenarchaeota y «Korarchaeota». Con la excepción de la metanogénesis, la bioenergética y el metabolismo intermediario es semejante a lo que se encuentra en *Bacteria*.

- ✓ ¿Qué organismo mostrado en la Figura 13.1, *Halobacterium* o *Methanopyrus*, posee un reloj evolutivo más lento?
- ✓ ¿Qué rutas autotróficas se encuentran en *Archaea*?

II PHYLUM EURYARCHAEOTA

13.3 Halófilos extremos

Géneros clave

Halobacterium
Haloferax
Natronobacterium

Las arqueas halófilas extremas constituyen un grupo diverso de procariotas que habitan ambientes de elevada salinidad tales como salinas, lagos salados naturales, o los hábitat salinos artificiales, como las superficies de alimentos en salazón (algunos tipos de pescado y carnes). A tales hábitat se les conoce como *hipersalinos*. El término *halófilo extremo* se usa para indicar no solamente que estos organismos son halófilos, sino para indicar que requieren obligatoriamente altas concentraciones de sal, incluso en algunos casos cercanas a la saturación. Un organismo halófilo extremo es aquel que requiere al menos 1,5 *M* (sobre el 9%) de NaCl; la mayoría de las especies requieren 2-4 *M* (12-13%) para el crecimiento óptimo. En la práctica, todos los halófilos extremos pueden crecer a 5,5 *M* (32%), aunque algunas especies crecen muy poco a esta concentración tan alta.

Ambientes hipersalinos

Los ambientes hipersalinos están bastante extendidos por todo el mundo, pero los *extremadamente* hipersalinos son más bien raros. La mayoría de éstos se encuentran en zonas calientes y secas. La composición iónica de los lagos salinos varía considerablemente; el predominio de unos u otros iones depende de la topografía, geología y condiciones climáticas generales que rodean el lago. El Gran Lago Salado estadounidense del estado de Utah (Figura 13.2*a*), por ejemplo, es fundamentalmente agua de mar concentrada porque la proporción relativa de cada ion es la del agua de mar, sólo que mucho más alta. El catión principal es el sodio, mientras que el anión primario es el cloro; existen cantidades significantes de sulfato y un ligero pH alcalino (Tabla 13.1). Por el contrario, el mar muerto es relativamente bajo en solio pero alto en magnesio (Tabla 13.1). La química del agua de los lagos carbonatados se asemeja al del Gran Lago Salado, pero debido a los carbonatos que se incorporan al agua de las rocas circundantes el pH es bastante más alcalino; valores de 10-12 no son infrecuentes (Tabla 13.1 y Figura 13.2*c*). Además el magnesio y calcio están prácticamente ausentes debido a que precipitan a altos valores de pH (Tabla 13.1).

A pesar de que parece que son ecosistemas duros para la vida, los lagos salados son ecosistemas muy bioproductivos. *Archaea* no son las únicas formas de vida que florecen allí. El alga microscópica *Dunaliella* es el principal (a veces el exclusivo) productor primario fotosintético. En lagos alcalinos el alga no puede proliferar y el escalón fotosintético está cubierto por bacterias púrpuras anoxigénicas del género *Ectothiorhodospira* y *Halorhodospira* (Sección 12.2) como formas predominantes. El material orgánico que origina el escalón primario, ya sean fotosintéticos oxigénicos o anoxigénicos, permite el crecimiento de *Archaea* halófilos que son quimioorganotrofos y aerobios. Adicionalmente, algunas formas anaerobias como *Haloanaerobium* y *Halobacteroides* pueden crecer también en estos ambientes.

Las salinas marinas son también buenos hábitat para los procariotas halófilos extremos. Como se sabe, las salinas son agua de mar estancada que se evapora lentamente por acción del Sol (Figura 13.2*b*, *d*). A medida que la salina se aproxima a una concentración mínima de sales para permitir el crecimiento de los halófilos extremos, las aguas se vuelven de color rojizo debido al *crecimiento* ma-

TABLA 13.1 Composición iónica de algunos ambientes altamente salinos[a]

	Concentración (g/l)		
Ion	Gran Lago Salado[b]	Mar Muerto	Lago Zugm[c]
Na^+	105	40,1	142
K^+	6,7	7,7	2,3
Mg^{2+}	11	44	< 0,1
Ca^{2+}	0,3	17,2	< 0,1
Cl^-	181	225	155
Br^-	0,2	5,3	—
SO_4^{2-}	27	0,5	23
HCO_3^-	0,7	0,2	67
pH	7,7	6,1	11

[a] En comparación, el agua de mar contiene (por litro): Na^+, 10,6 g; K^+, 0,38 g; Mg^{2+}, 1,27; Ca^{2+}, 0,4 g; Cl^-, 19;Br^-, 0,065 g; SO_4^{2-}, 2,65; HCO_3^-, 0,14 g; pH 8.

[b] *Véase* Figura 13.2*a*.

[c] Wadi El Natroun, Egipto (*véase* Figura 13.2*c*).

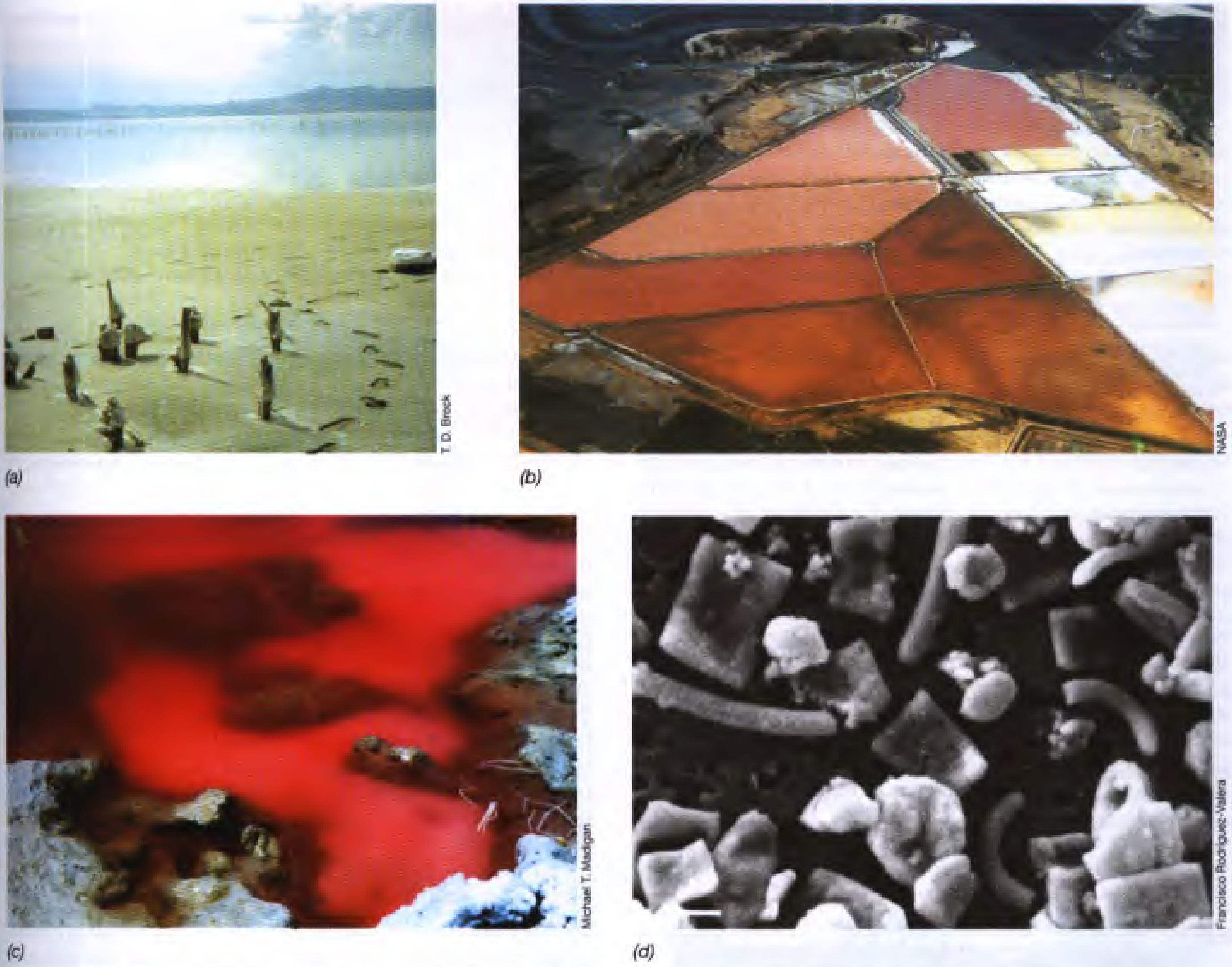


Figura 13.2 Hábitat hipersalinos. (a) Gran Lago Salado en Utah, un lago hipersalino en el que la relación iónica es similar al agua de mar pero con una concentración absoluta diez veces superior. El color verde es debido fundamentalmente a las algas verdes halófilas, *Dunaliella salina*. (b) Vista aérea de la Bahía de San Francisco, California mostrando una serie de estanques de evaporación donde se prepara sal común. El color rojo-púrpura es debido a las bacteriorruberinas y bacteriorrodopsina de *Halobacterium*. (c) Lago Hamara, Wadi El Natroun (Egipto). Crecimiento de un alcalófilo pigmentado en este lago carbonatado (~~pH 10~~). Nótense los depósitos de Na_2CO_3 alrededor de los bordes del lago. (d) Micrografía de procariotas alcalófilos tales como las bacterias cuadradas presentes en salinas españolas.

sivo de arqueas halofílicas (la coloración rojiza apreciable en la Figura 13.2*b* y *c* proviene de los carotenoides y otros pigmentos que se discutirán más adelante). También suelen encontrarse en las salinas, procariotas muy inusuales como es el caso de las bacterias cuadradas (Figura 13.2*d*). Por último también se aíslan halófilos extremos en alimentos con alta concentración de sal, como salchichas, pescado y embutidos de cerdo.

Taxonomía y fisiología de *Archaea* halófilos extremos

La Tabla 13.2 recoge las especies reconocidas de este grupo bacteriano. El rRNA de 16S, la secuenciación de DNA y otros criterios han definido 10 géneros de halófilos extremos (Tabla 13.2). Frecuentemente, reciben la denominación de «halobacterias» a consecuencia del género clásico *Halobacterium* (Figura 13.3), que fue el primero en ser descrito y todavía sigue siendo el más estudiado. *Natronobacterium, Natronomonas* y relacionados difieren del resto del grupo en que además son extremadamente alcalofílicos. (*véase* Tabla 13.1 y Figura 13.2*c*); el crecimiento óptimo se consigue a concentraciones muy bajas de magnesio Mg^{2+} y elevadas de pH (9-11).

Reaccionan al Gram *negativamente* y se reproducen por fisión binaria no dando lugar ni formas de resistencia ni a esporas de ninguna clase. La mayoría de las halobacterias

TABLA 13.2 Géneros de *Archaea* halófilos extremos

Género	Morfología	Número de especies	DNA (GC mol %)	Hábitat
Halófilos extremos				
Halobacterium	Bacilos	1	66-71	Pescado salado; lagos hipersalinos; salinas
Halorubrum	Bacilos	7	62-71	Mar Muerto; salinas
Halobaculum	Bacilos	1	70	Mar Muerto
Haloferax	Discos planos	4	60-66	Mar Muerto; salinas
Haloarcula	Discos irregulares	7	63-65	Valle de la muerte; lagos salinos; Salinas
Halococcus	Cocos	3	59-66	Pescado salado; salinas
Halogeometricum	Bacilos	1	59-60	Salinas
Haloterrigena	Bacilos, óvalos	1	59-60	Suelos salinos
Haloalcalófilos				
Natronobacterium	Bacilos	1	65	Lagos carbonatados hipersalinos
Natrinema	Bacilos	2	70	Pescado salado
Natrialba	Bacilos	2	60-63	Lagos carbonatados. Arena salada
Natronomonas	Bacilos	1	61-64	Lagos carbonatados
Natronococcus	Cocos	2	63-64	Lagos carbonatados
Natronorubrum	Células aplanadas	2	59-60	Lagos carbonatados

son **inmóviles** pero algunas se mueven ligeramente mediante flagelos. La organización genómica de *Halobacterium* y *Halococcus* es inusual, en el sentido de que poseen grandes plásmidos que representan hasta el 30% del total de DNA celular con un GC (57-60) claramente diferente del DNA cromosómico (66-68). Estos plásmidos están entre los más grandes descritos en la naturaleza (*véase* Sección 10.8).

Las bacterias halófilas son quimioorganotrofas y la mayoría aerobias estrictas. Utilizan aminoácidos o ácidos orgánicos como fuente de carbono y energía y requieren bastantes (principalmente vitaminas) factores de crecimiento. Algunas especies del género *Halobacterium* oxidan carbohidratos, pero ésta es una capacidad rara entre las halobacterias. Poseen cadenas transportadoras de electrones con citocromos *a*, *b* y *c* y la energía se conserva en crecimiento aeróbico gracias a una fuerza motriz de protones generada en la membrana y mediada por quimioósmosis. Algunas formas crecen en anaerobiosis. En estos casos, es a expensas de fermentar azúcares o por respiración anaerobia (*véase* Sección 17.13) unida a la reducción de nitrato o fumarato.

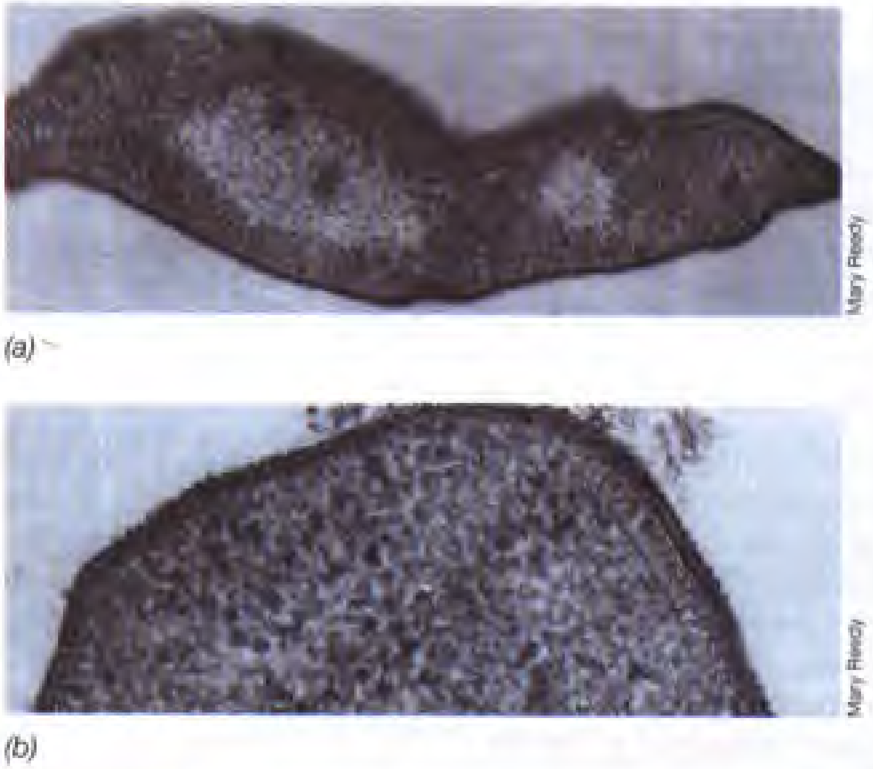


Figura 13.3 Micrografías electrónicas de cortes finos del halófilo extremo *Halobacteriun salinarum*. Una célula tiene un diámetroaproximado de 0,8 μm. (a) Sección longitudinal. (b) Detalle a mayor aumento mostrando la estructura glicoproteica de la pared celular.

Balance de agua en los halófilos

Estas bacterias requieren grandes cantidades de sodio para crecer. En el caso de *Halobacterium*, donde se han llevado a cabo detallados estudios de salinidad, el ion K^+ no puede remplazarse por otro, ni siquiera por el potasio. Vimos en la Sección 6.12 cómo ciertos microorganismos pueden soportar las fuerzas osmóticas que acompañan a la vida que se desarrolla en ambientes con muchos solutos, como es la acumulación intracelular de compuestos orgánicos que llamamos **biocompatibles**. Estos solutos contrarrestan la tendencia celular a deshidratarse en ambientes con mucha fuerza osmótica manteniendo una actividad de agua apropiada para el desarrollo de su bioquímica, en lo que se denomina un *balance de agua positivo con el medio ambiente*. En el caso de *Halobacterium* bombea grandes cantidades de potasio hacia el interior celular, hasta tal punto, que la concentración dentro de la célula es varias veces superior al sodio extracelular (Tabla 13.3).

La pared celular de *Halobacterium* está formada de una glicoproteína estabilizada por iones sodio, que es fundamental para mantener la integridad celular; cuando escasea el sodio la célula simplemente se lisa. Esto es debido a la presencia de enormes cantidades de aminoácidos negati-

TABLA 13.3 Concentración de iones en las células de *Halobacterium salinarum*

Ion	Concentración en el medio (*M*)	Concentración en las células (*M*)
Na^+	3,3	0,8
K^+	0,05	5,3
Mg^{2+}	0,13	0,12
Cl^-	3,3	3,3

vamente cargados como son el aspartato y el glutamato en tal glicoproteína de superficie. Cuando hay suficiente sodio, las cargas negativas de los grupos carboxilos están neutralizadas por este catión, pero cuando es insuficiente la repulsión electrostática de las cargas negativas conduce a lisis celular.

Componentes citoplasmáticos de los halófilos

Como las proteínas de las paredes celulares, las proteínas citoplasmáticas de *Halobacterium* son también altamente acídicas y requieren potasio para la actividad en lugar de sodio lo cual no es sorprendente, cuando se tiene en cuenta que K^+ es el catión interno predominante en las células de *Halobacterium* (Tabla 13.3). Además, las proteínas citoplasmáticas contienen muy baja proporción de aminoácidos hidrofóbicos como lisina, sobre todo si se compara con bacterias no halófilas. Esto también tiene sentido, pues las proteínas muy polares en un medio muy iónico tienden a permanecer en solución, mientras que las no polares tienden a agruparse y perder actividad. Los ribosomas de *Halobacterium* también requieren altos niveles de potasio para la estabilidad (los ribosomas de los no halófilos no tienen tales requerimientos). Por todo ello, es bastante evidente que las *Archaea* halófilas extremas están altamente adaptadas tanto hacia fuera como hacia dentro a hábitat salinos. Los componentes celulares que están expuestos hacia fuera requieren sodio mientras que los que están expuestos hacia dentro requieren, como se ha visto, potasio. Con la excepción de unos pocos halófilos extremos de *Bacteria* que también utilizan el potasio como soluto compatible, en ningún otro grupo se da esta peculiaridad de tan alto requerimiento de cationes para el mantenimiento de la actividad biológica.

Bacteriorrodopsina y síntesis de ATP mediada por luz

Ciertas especies de *Archaea* halófilas extremas son capaces de llevar a cabo síntesis de ATP mediada por luz y no implica el uso de la clorofila (por lo que no es fotosíntesis). La naturaleza altamente pigmentada de los halófilos extremos se puede observar en la Figura 13.2. Este color rojo anaranjado es debido a los carotenoides, principalmente C_{50} que se llaman *bacteriorruberinas* y también a pigmentos inducibles implicados en el metabolismo energético. Bajo condiciones de baja aireación, *Halobacterium salinarium* y otros halófilos extremos sintetizan e insertan en sus membranas una proteína denominada **bacteriorrodopsina**. Se denominan así por su similitud estructural y funcional con el pigmento visual rodopsina. Conjugada con la bacteriorrodopsina existe una molécula de retinal, una molécula carotenoídica, que puede absorber luz y catalizar la génesis de una fuerza motriz de protones (Figura 13.4). El retinal da a la bacteriorrodopsina un tinte púrpura de tal modo que las células de *Halobacterium*, que se cambian al crecer en condiciones de alta aireación a un estado de baja concentración de oxígeno (un disparador de la síntesis de bacteriorrodopsina), ocurre un cambio gradual de color desde naranja hasta rojo-púrpura a medida que aumenta la cantidad de bacteriorrodopsina insertada en la membrana citoplasmática.

La bacteriorrodopsina absorbe fuertemente luz en la región verde del espectro alrededor de 570 nm. El retinal de la bacteriorrodopsina que normalmente existe en forma *trans* es excitado por la luz y convertido a forma *cis* (Figura 13.4). Esta transformación produce la translocación de protones hacia el *exterior* de la superficie de la membrana. Entonces la molécula de retinol vuelve a su isómero trans más estable en la oscuridad e incorpora un protón del citoplasma, completándose así el ciclo (Figura 13.4). A medida que los protones se acumulan en la superficie externa de la membrana, se incrementa la fuerza motriz de protones (*véase* Sección 5.12) hasta que la membrana está suficientemente «cargada» para dirigir la síntesis de ATP mediante la acción de una ATPasa translocadora de protones (Figura 13.4).

La producción de ATP mediada por luz en *Halobacterium salinarium*, se ha visto que soporta un lento crecimiento en anaerobiosis bajo condiciones nutricionales en las que no tiene lugar ningún otro mecanismo energético. La luz

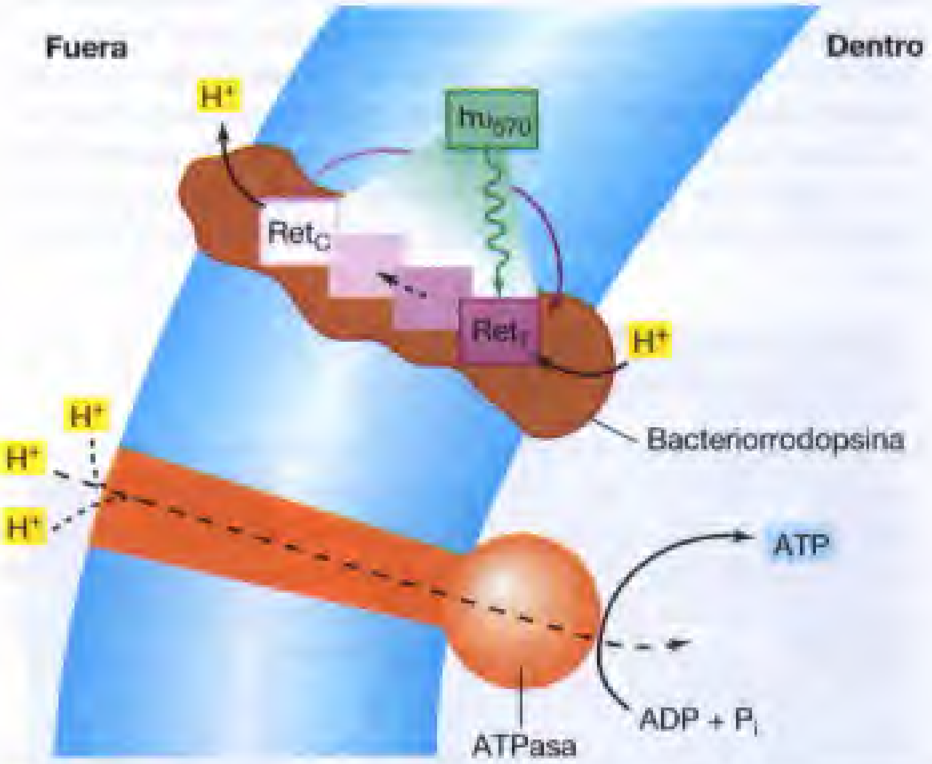


Figura 13.4 Modelo propuesto para el mecanismo de acción de la bacteriorrodopsina. La luz de 570 nm ($h\upsilon_{570}$) convierte la forma protonada del retinal de la bacteriorrodopsina de la forma *trans* (Ret_T) a la forma *cis* (Ret_C), junto con la translocación de un protón hacia la superficie externa de la membrana, produciéndose una fuerza matriz de protones, que dirige la actividad de la ATPasa (*véase* Sección 5.12).

mantiene la viabilidad de estos cultivos en condiciones anaeróbicas aún en ausencia de fuentes orgánicas. La bomba de protones también funciona bombeando sodio al exterior celular por acción de un antitransportador Na^+/H^+ (*véase* Sección 4.6) y para llevar a cabo la toma de nutrientes, tal como el K^+, que ha de acumularse como soluto compatible. La incorporación de aminoácidos en *H. salinarium* está indirectamente condicionada por la luz, ya que ocurre por un co-transportador (simportador) aminoácido/Na^+/ Sección 4.6). La toma continuada depende de que se elimine el sodio bajo la acción del antiportador Na^+/H^+ (impulsado por la luz).

Otras rodopsinas

Se conocen al menos otras tres rodopsinas en la membrana de *H. salinarium*, además de la bacteriorrodopsina. La **halorrodopsina** es una bomba impulsada por luz que bombea Cl^- hacia el interior celular para contrarrestar el K^+. El retinal de la halorrodopsina une CH^- y lo transporta hacia la célula. En *H. salinarium* hay dos **rodopsinas sensoras**. Se trata de sensores de luz que controlan la fototaxis (*véase* movimiento hacia la luz, Sección 4.12). A través de la interacción de una cascada de proteínas semejante a la que ocurre en una quimiotaxis (*véanse* Secciones 4.12 y 8.11), estas rodopsinas sensoras afectan al movimiento flagelar que impulsa a la bacteria hacia la luz donde pueden llevar a cabo la síntesis de ATP (Figura 13.4)

Veremos más adelante (*véase* Sección 19.6) que en aguas oceánicas existen microorganismos de *Bacteria* que contienen moléculas semejantes a la bacteriorrodopsina que se llaman *proteorrodopsinas*. Funcionan de manera semejante a lo visto para la bacteriorrodopsina de las halobacterias, excepto que existen varios tipos, cada una sintonizada a una determinada longitud de onda de luz. Las proteorrodopsinas, como mecanismo de conservación de energía en procariotas marinos, tiene un gran sentido ecológico ya que la cantidad de materia orgánica disuelta en aguas abiertas es extremadamente baja (*véase* Sección 19.6), por lo que un modo de vida estrictamente quimioorganotrofo en esos hábitat sería muy difícil.

✓ 13.3 Revisión de conceptos

Los microorganismos halófilos extremos son procariotas que requieren grandes cantidades de cloruro sódico para el crecimiento. Estos organismos bombean mucho cloruro potásico hacia el citoplasma como soluto compatible. Estas sales afectan a la estabilidad de la pared celular de las moléculas enzimáticas. La bomba protónica de bacteriorrodopsina ayuda a los halófilos extremos a conseguir ATP extra.

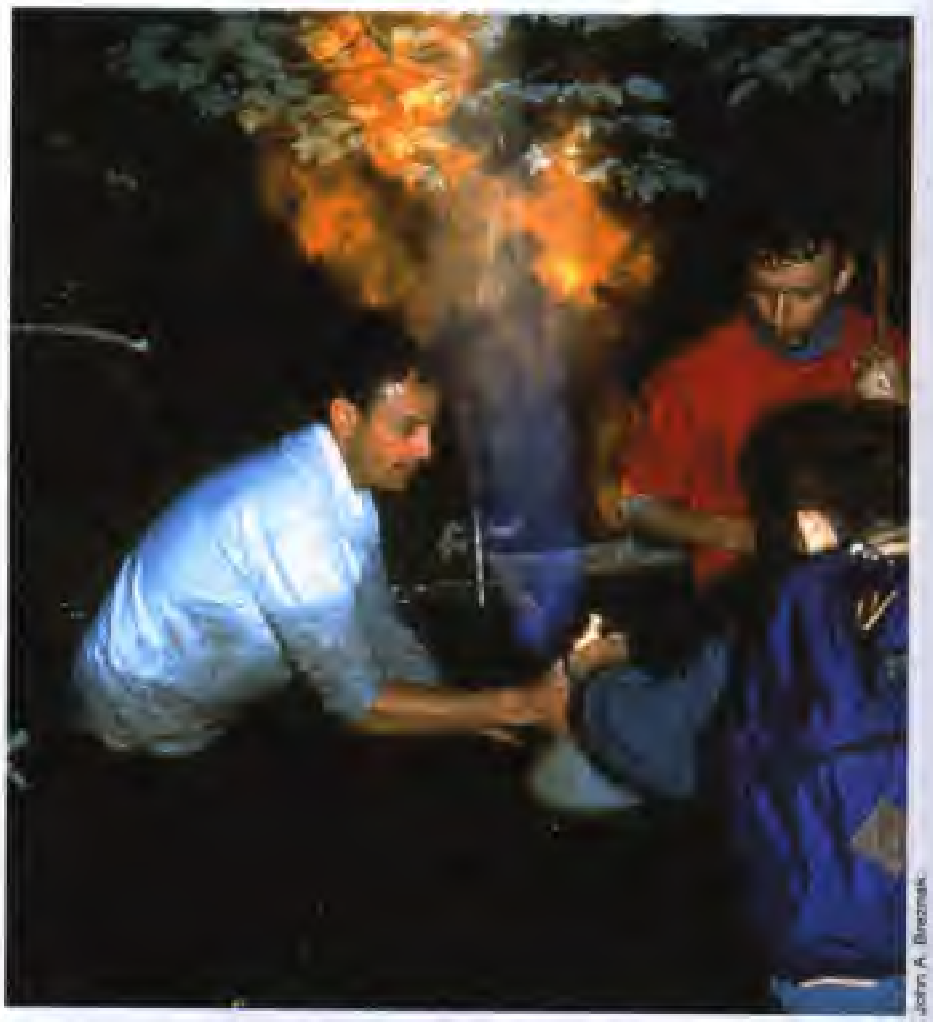
- ✓ ¿Cuál es la diferencia más importante entre *Halobacterium* y *Natronobacterium?*
- ✓ Si las células de *Halobacterium* requieren altos niveles de Na^+, ¿por qué esto no es válido para las enzimas citoplasmáticas?
- ✓ ¿Qué beneficio proporciona la bacteriorrodopsina a *H. salinarium?*

13.4 *Archaea* productoras de metano: metanógenos

Géneros clave

Methanobacterium
Methanococcus
Methanosarcina

Un gran número de Euryarchaeota produce metano (CH_4) como una parte integral del metabolismo. Tales organismos se denominan *metanógenos* y al proceso de formación de este gas, *metanogénesis*. El metano fue inicialmente descubierto, y denominado como «aire combustible», por el físico italiano Alessandro Volta quien lo extraía de los sedimentos pantanosos y demostró que era inflamable (el «experimento Volta» puede reproducirse fácilmente removiendo los fangos de un pantano en un embudo y aplicando una llama en la parte más estrecha) (Figura 13.5). En los últimos capítulos, se estudiará la bioquímica im-



John A. Breznak

Figura 13.5 «El experimento Volta» tal como se demuestra en el Curso de Verano «Diversidad Microbiana» de Woods Hole, Massachussets. Se coloca un gran embudo invertido sobre los sedimentos en agua dulce donde se estaba produciendo una descomposición anaeróbica en Cedar Swamp, Woods Hole. Después de que el agua hubo desplazado el aire del embudo, éste se taponó y se removieron los sedimentos permitiendo que las burbujas de metano atrapadas se liberen y se concentren en la parte superior del embudo invertido. Inmediatamente después de destaponar el embudo, se aproximó una llama a la boca del embudo produciéndose la ignición del metano. Este experimento fue llevado a cabo hace unos 200 años por el fisico italiano Alessandro Volta que le llevó a considerar al metano como «aire combustible».

TABLA 13.4 Hábitat de los metanógenos

I. Sedimentos anóxicos: fangos pantanosos (*véase* Figura 13.5) y sedimentos de lagos. Suelos apretados con alta humedad (*véase* Sección 19.10)
II. Tractos digestivos de animales:
    (a) Rumen de vacas, ovejas, camellos, ciervos, etc. (*véase* Sección 19.11)
    (b) Cecum de caballos o conejos(*véase* Sección 19.11)
    (c) Intestino grueso de animales monogástricos (*véase* Sección 21.4)
    (d) Intestino de insectos celulolíticos (termitas).
III. Fuentes hidrotermales de $H_2 + CO_2$: fuentes hidrotermales submarinas (*véase* Sección 28.2)
IV. Disgestores de fangos activados
V. Endosimbiontes de varios protozoos anaerobios (*véase* Figura 19.26)

plicada en este proceso fascinante de la metanogénesis (*véase* Sección 17.17) y cómo estos organismos son el escalón final de la biodegradación de la materia orgánica en ambientes anaerobios, tales como en los pantanos que se indica en la Figura 13.5 (*véase* Sección 19.10). Las fuentes principales de metano biogénico se indican en la Tabla 13.4.

Diversidad y fisiología de los metanógenos

Se han descrito una gran variedad de tipos morfológicos de metanógenos (Figuras 13.6 y Tabla 13.5). Su taxonomía se basa tanto en características fenotípicas como filogenéticas, siendo además posible el reconocimiento de diversos órdenes que agrupan familias bien definidas de bacterias metanogénicas (*véase* Tabla 11.6). Estructuralmente, son células procarióticas que poseen diversos tipos de paredes celulares que incluyen la seudomureína que presentan las paredes celulares de *Methanobacterium* y relacionados (Figura 13.7*a*), la metanocondroitina (se asemeja al condroitín sulfato, el tejido conectivo de los tejidos de vertebrados) de *Methanosarcina* y relacionados (Figura 13.7*b*) y las glicoproteínas de pared de *Methanococcus* y *Methanoplanus* (Figura 13.6; *véase* Sección 4.8).

Fisiológicamente, los metanógenos son anaerobios estrictos y se necesitan instalaciones de anaerobios para trabajar con ellos. Dependiendo de la especie en cultivo, puede hacerse en medios minerales suplementados con fuente de hidrógeno y anhídrido carbónico (relación 4:1) o también en medios complejos. La mayor parte de los metanógenos conocidos son mesófilos aunque también se han descrito «extremófilos» para la temperatura o salinidad (*véanse* Figuras 13.8 y 13.13).

Sustratos para metanogénesis

Existen al menos 11 sustratos susceptibles de ser metanizables por cultivos puros de metanobacterias (Tabla 13.6). Estos sustratos no incluyen los sustratos comunes como glucosa o ácidos orgánicos (excepto el acetato) o ácidos grasos. En el Capítulo 19, se resumen las reacciones cooperativas que están implicadas en la metanogénesis y que muestran que, virtualmente, cualquier sustrato orgánico puede ser convertido en metano y anhídrido carbónico (*véase* Sección 19.10).

Tres clases de compuestos de una lista de 10 se recogen en la Tabla 13.6; estos incluyen los de tipo CO_2, sustratos metílicos y acetato. La primera clase incluye un sustrato muy importante como es el CO_2 que es reducido hasta metano utilizando el hidrógeno como fuente de poder reductor:

$$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O \qquad \Delta G^{0'} = -131 \text{ kJ}$$

Otros sustratos incluyen el formato y monóxido de carbono.

La segunda clase de sustrato metanogénico son sustancias con grupos metilo (Tabla 13.6). Utilizando metanol como modelo metílico, la formación de metano puede ocurrir de dos formas. La primera que incluye la reducción del metanol por una fuente externa de electrones como es el hidrógeno:

$$CH_3OH + H_2 \rightarrow CH_4 + H_2O \qquad \Delta G^{0'} = -113\text{kJ}$$

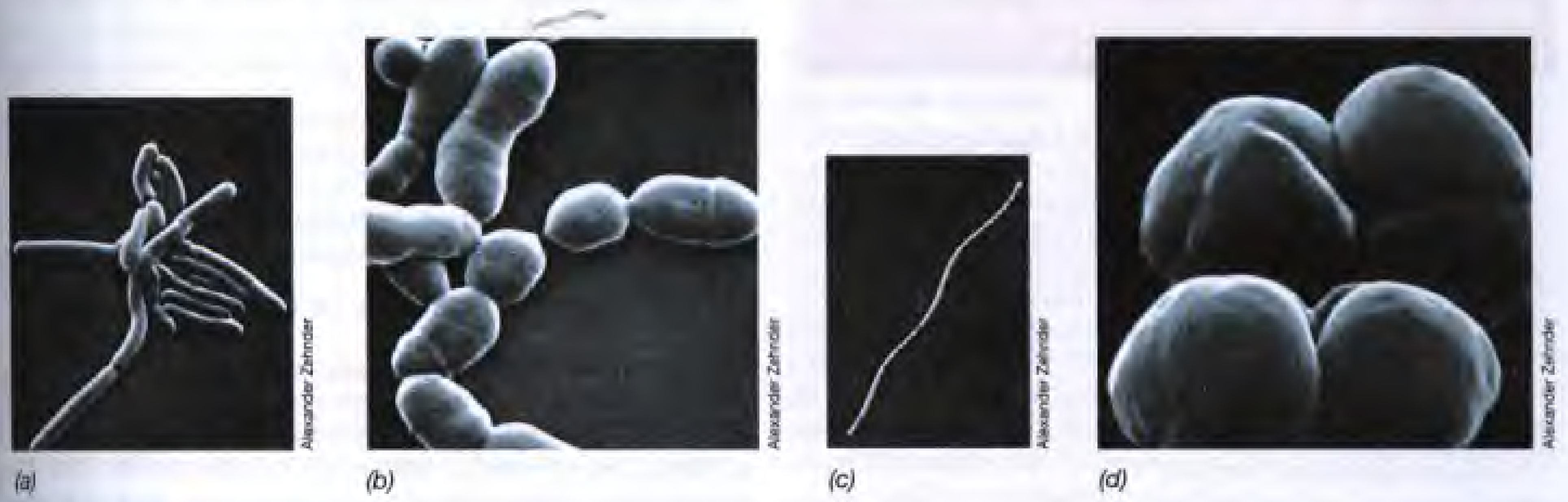


Figura 13.6 Micrografías de barrido de *Archaea* metanogénicas mostrando una considerable diversidad morfológica. (a) *Methanobrevibacter ruminantium*. Su diámetro aproximado es de 0,7 µm. (b) *Methanobrevibacter arboriphilus*. Su diámetro es aproxidamente de 1 µm. (c) *Methanospirillum hungatii*. Su diámetro es aproxidamente de 0,4 µm. (d) *Methanosarcina barkeri*. Su diámetro es aproxidamente de 1,7 µm.

TABLA 13.5 Características de *Archaea*[a] metanogénicas

Género	Morfología	Número de especies	Sustratos para metanogénesis	DNA (GC mol %)
Methanobacteriales				
Methanobacterium	Bacilos largos	8	$H_2 + CO_2$, formiato	30-55
Methanobrevibacter	Bacilos cortos	7	$H_2 + CO_2$, formiato	27-31
Methanosphaera	Cocos	2	Metanol + H_2 (ambos requeridos)	23-26
Methanothermus	Bacilos	2	$H_2 + CO_2$; puede reducir S^0; hipertermófilo	33
Methanothermobacter	Bacilos	6	$H_2 + CO_2$, formiato, thermophiles	32-61
Methanococcales				
Methanococcus	Cocos irregulares	3	$H_2 + CO_2$, formiato, piruvato + CO_2	29-35
Methanothermococcus	Cocos	1	$H_2 + CO_2$, formiato	31-34
Methanocaldococcus	Cocos	4	$H_2 + CO_2$	31-33
Methanotorris	Cocos	1	$H_2 + CO_2$	31
Methanomicrobiales				
Methanomicrobium	Bacilos cortos	1	$H_2 + CO_2$, formiato	49
Methanogenium	Cocos irregulares	4	$H_2 + CO_2$, formiato	47-52
Methanospirillum	Espirilos	1	$H_2 + CO_2$, formiato	45-50
Methanoplanus	Células en forma de placa-dispuestas como finas placas con los bordes afilados	3	$H_2 + CO_2$, formiato	39-50
Methanocorpusculum	Cocos irregulares	4	$H_2 + CO_2$, formiato, alcoholes	48-52
Methanoculleus	Cocos irregulares	6	$H_2 + CO_2$, formiato, alcoholes	49-61
Methanofollis	Cocos irregulares	2	$H_2 + CO_2$, formiato	54-60
Methanolacinia	Bacilos irregulares	1	$H_2 + CO_2$, alcoholes	38-45
Methanosarcinales				
Methanosarcina	Cocos grandes e irregulares en paquetes cúbicos	5	$H_2 + CO_2$, metanol, metilaminas, acetato	36-43
Methanolobus	Cocos irregulares en agregados	5	Metanol, metilaminas	39-46
Methanohalobium	Cocos irregulares	1	Metanol, metilaminas; halófilo	37
Methanococcoides	Cocos irregulares	2	Metanol, metilaminas	42
Methanohalophilus	Cocos irregulares	3	Metanol, metilmina, halófilo	39-41
Methanosaeta	Bacilos alargados o filamentos	2	Acetato	52-61
Methanosalsum	Cocos irregulares	1	Metanol, metilaminas, sulfuro de dimetilo	38-40
Methanopyrales				
Methanopyrus	Bacilos en cadenas	1	$H_2 + CO_2$; hipertermófilo crece a 110°C	60

[a] Los órdenes taxonómicos están listados en negrita.

TABLA 13.6 Sustratos metanolizables por varias *Archaea* metanogénicas

I. **Sustratos de tipo CO_2**
   - Dióxido de carbono, CO_2 (con electrones derivados del H_2, ciertos alcoholes o el piruvato,
   - Formato, $HCOO^-$
   - Monóxido de carbono, CO

II. **Sustratos metílicos**
   - Metanol, CH_3OH
   - Metilamina, $CH_3NH_3^+$
   - Dimetilamina, $(CH_3)_2NH_2^+$
   - Trimetilamina, $(CH_3)_3NH^+$
   - Metilmercaptano, CH_3SH
   - Sulfuro de dimetilo, $(CH_3)_2S$

III. **Sustratos acetotróficos**
   - Acetato, CH_3COO^-
   - Piruvato, CH_3COCOO^-

Alternativamente y en ausencia de hidrógeno, algo de metanol puede oxidarse hasta dióxido de carbono para generar los electrones necesarios para reducir otras moléculas de metanol hasta metano:

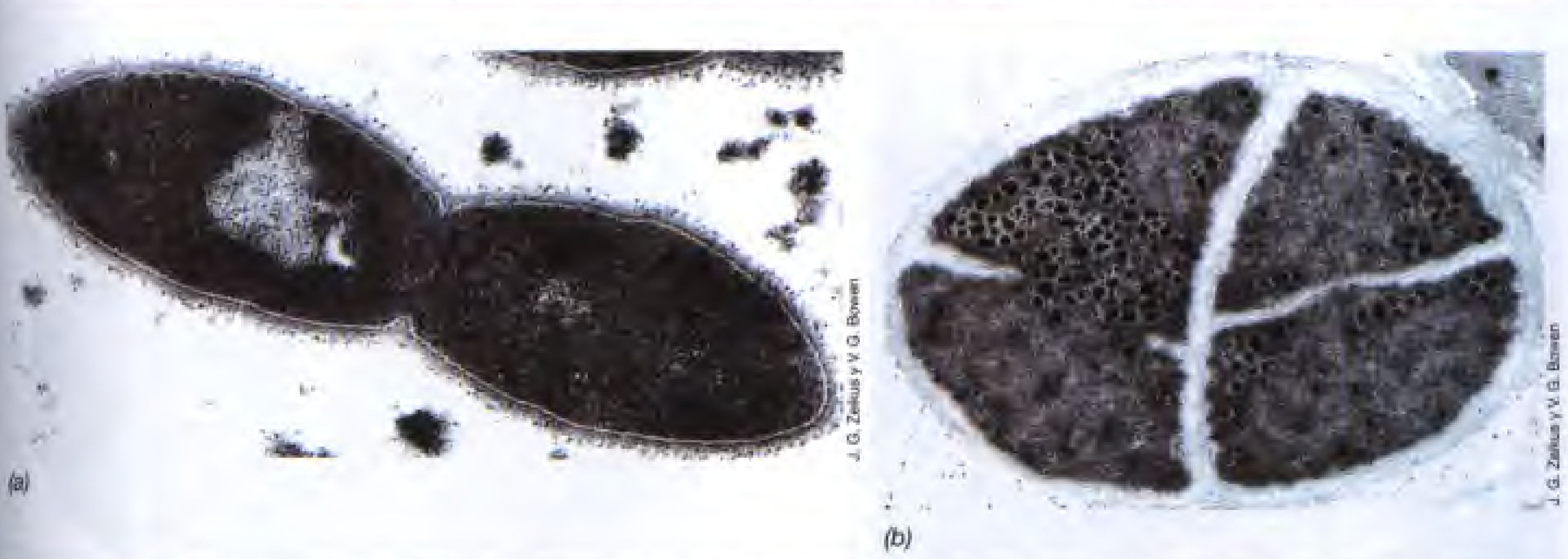
$$4\,CH_3OH \rightarrow 3\,CH_4 + CO_2 + 2\,H_2O \qquad \Delta G^{0'} = -319 kJ$$

El último proceso metanogénico es la ruptura de acetato hasta dióxido de carbono y metano:

$$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^- \qquad \Delta G^{0'} = -31 kJ$$

Sólo algunos metanógenos son acetotróficos (Tabla 13.5), pero aproximadamente dos tercios del metano generado en la metanogénesis a partir de fangos activados deriva del acetato, y solamente un tercio lo hace a partir del anhídrido carbónico e hidrógeno; es decir, este tipo de acetotrofia tiene un gran significado en la naturaleza.

Todas las reacciones anteriores son exotérmicas y pueden utilizarse para generar ATP. La bioquímica de estos



J. G. Zeikus y V. G. Bowen

J. G. Zeikus y V. G. Bowen

Figura 13.7 Micrografías electrónicas de transmisión de cortes finos de *Archaea* metanogénicos. (a) *Methanobrevibacter ruminantium*. Su diámetro es de 0,7 µm. (b) *Methanosarcina barkeri*, mostrando su gruesa pared celular y la forma de dividirse y formación de la pared celular transversal. La pared celular de *M. ruminantium* contiene pseudopeptidoglicano (*véase* Figura 4.34a), mientras que la parede celular de *M. barkeri* contiene proteínas y peptidogliconos. Su diámetro aproximado es de 1,7 µm.

procesos se indica con detalle en el Capítulo 17 y aquí solamente resaltamos que la metanogénesis está íntimamente ligada a una fuerza motriz de protones para la síntesis de ATP siguiendo la quimioosmosis (*véase* Sección 5.12). No ocurre en este grupo de bacterias, fosforilación a nivel de sustrato como ocurre en bacterias fermentativas.

Metanocaldococcus jannaschii como modelo de una *Archaea* metanogénica

Como se indicó en la Sección 15.3, se ha terminado la secuencia completa del genoma de *Metanocaldococcus jannaschii* (Figura 13.8*a*). El análisis de sus 1,66 mB que constituyen un cromosoma circular y que contiene 1.700 genes, predice la presencia de genes típicos de la metanogénesis. Es interesante que los genes del metabolismo central y de división celular recuerdan a los de *Bacteria*, pero los de la transcripción y traducción recuerdan a los de eucariotas. Estos hallazgos apoyan el árbol evolutivo de la vida que contempla al dominio *Archaea* posicionado entre los dominios *Bacteria* y Eukarya (*véanse* Sección 11.7 y Figura 11.13). Sin embargo, el análisis genómico revela que casi el 50% de los genes de esta metanobacteria no tienen nada parecido ni en *Bacteria* ni en *Eukarya*, lo que sugiere que debe de existir una pléyade de funciones celulares de las que nada se sabe y que serán estudias en los años venideros.

✓ 13.4 Revisión de conceptos

Los metanógenos son anaerobios estrictos cuyo metabolismo está ligado a la producción de metano (CH_4).

- ✓ ¿Qué demuestra el experimento de Volta?
- ✓ ¿Cuáles son los sustratos más importantes para la metanogénesis?

13.5 Thermoplasmatales: *Thermoplasma, Ferroplasma* y *Picrophilus*

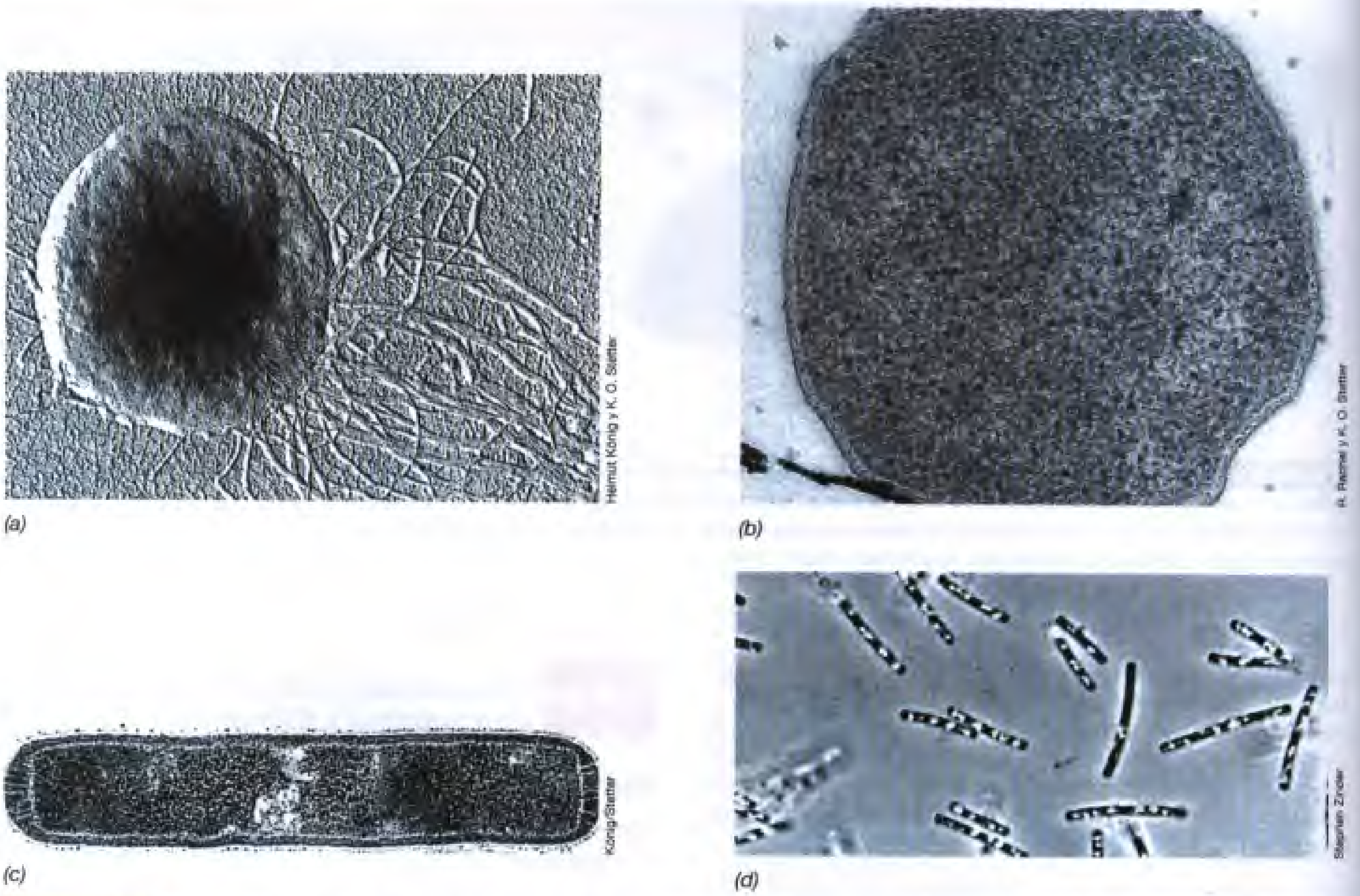
Géneros clave

Thermoplasma
Picrophilus

Una línea filolgenéticamente diferente de *Archaea* contiene tres procariotas termófilos y acidófilos extremos: *Thermoplasma, Ferroplasma y Picrophilus* (Figura 13.1). Estos organismos se encuentran entre los más acidófilos de todos los procariotas conocidos y en el caso del *Picrophilus* puede incluso crecer por debajo de pH 0. Forman su propio orden dentro de los Euryarchaeota, se parecen a los micoplasmas y los denominamos Thermoplasmatales. Empezaremos con una descripción del microorganismo que se parece a los micoplasmas, *Thermoplasma*.

Thermoplasma y *Ferroplasma*: dos *Archaea* sin pared celular

Thermoplasma (Figura 13.9*a*) es un quimioorganotrofo que crece óptimamente a 55°C y pH 2 en medios complejos. Se han descrito dos especies: *T. acidophilum y T. volcanicum*. Son aerobios facultativos, que pueden crecer aeróbicamente o anaeróbicamente respirando azufre. Desde un punto de vista morfológico recuerdan a los micoplasmas (Sección 12.22), en que carecen de pared celular. La mayor parte de las cepas de *Thermoplasma* se han aislado de pilas de restos de carbón y de pirita (FeS) que entran en combustión espontánea (Figura 13.10). En estas condiciones crece *Thermoplasma*, que parece metabolizar los compuestos orgánicos generados en la combustión del carbón. La segunda especie de *Thermoplasma, T. volcanium* se ha aislado de sulfataras volcánicas y son móviles por múltiples flagelos (Figura 13.9*b*).



Hellmut König y K. O. Stetter

R. Rachel y K. O. Stetter

König/Stetter

Stephen Zinder

Figura 13.8 Metanógenos termofílicos e hipertermofílicos. (a) *Methanocaldococcus jannaschii* (temperatura óptima de 85°C), preparación sombreada para microscopía electrónica. Su diámetro es aproximadamente de 1 µm. (b) *Methanotorris igneus* (temperatura óptima de 88°C), corte fino. Su diámetro es aproximadamente de 1 µm. (c) *Methanothermus fervidus* (temperatura óptima de 88°C), corte fino. Su diámetro es aproximadamente de 0,4 µm. (d) *Methanosaeta thermophila* (temperatura óptima de 60°C), contraste de fases. Su diámetro es aproximadamente de 1 µm. Los cuerpos refráctiles dentro de las células son vesículas de gases.

Para poder sobrevivir a las condiciones de estrés osmótico sin una pared celular, y resistir las dos condiciones extremas de bajo pH y elevada temperatura, *Thermoplasma* ha desarrollado una membrana celular con una estructura químicamente única. Contiene un material semejante al lipopolisacárido (conocido como *lipoglicano* en los micoplasmas) (Sección 12.22) que es un lípido *tetraéter* con manosa y glucosa (Figura 13.11) y constituye una porción muy alta de los lípidos totales. La membrana también contiene glicoproteínas pero no esteroles. Estas moléculas, además de otras, hacen que la membrana de *Thermoplasma* sea estable a las condiciones ácidas.

El genoma de *Thermoplasma* es interesante. Como otros micoplasmas (*véanse* Secciones 12.22 y 15.3), *Thermoplasma* posee un genoma pequeño (1,5 mB) y además el DNA está asociado a una proteína muy básica formando estructuras esféricas que recuerdan a los nucleosomas de los eucariotas (*véase* Sección 7.3, donde se expone la estrucura y disposición del DNA en eucariotas). Esta proteína es semejante a las histonas de las células eucarióticas. Proteínas que se unen al DNA similares a las histonas también se ha encontrado en varias Euryarchaeota hipertermófilas (*véase* Sección 13.11).

Ferroplasma es un quimiolitotrofo relacionado a *thermoplasma*. Carece de pared celular y es acidófilo, no es termófilo y crece a 35°C. *Ferroplasma* oxida ion ferroso a férrico (Figura 19.38) obteniendo así la energía (esta reacción produce ácido; *véanse* Sección 19.14 y leyenda de la Figura 13.15) y además asimila el dióxido de carbono por ser autotrofo. *Ferroplasma* crece en las minas de pirita (FeS), su fuente de energía. La acidofilia extrema de *Ferroplasma* hace que el pH de su hábitat disminuya hasta volverse extremadamente bajo. Se piensa que después de que se haya producido una acidez moderada a partir de la oxidación del Fe^{2+} por organismos tales como *Thiovacillus ferroosidans* y *Leptospirillum ferroosidans*, *Ferroplasma* crece y genera los bajísimos valores de pH que son típicos de las minas ácidas mencionadas (*véanse* Figura 19.38 y Secciones 19.14 y 19.15).

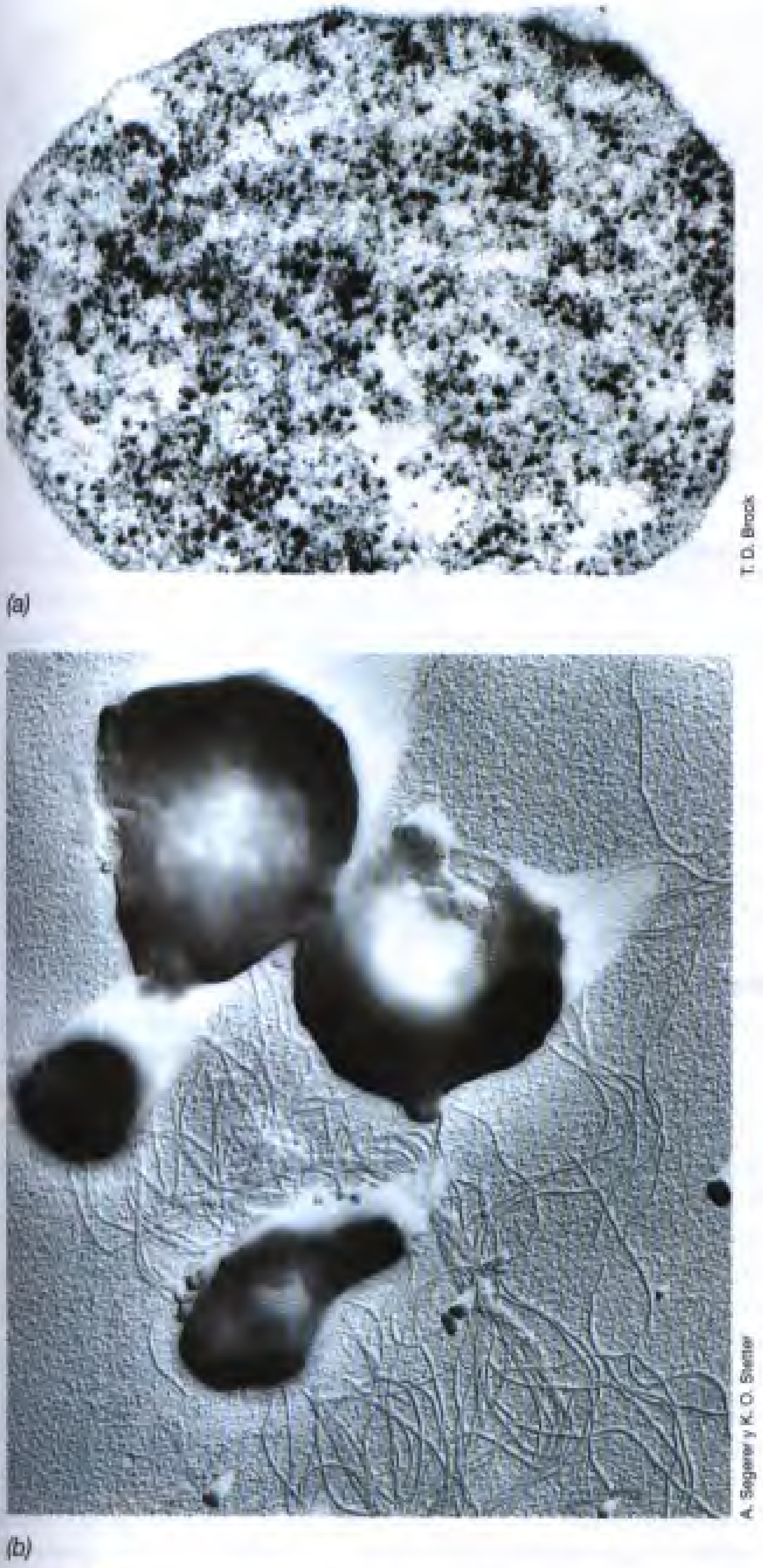


Figura 13.9 Especies de *Thermoplasma*. (a) *Thermoplasma acidophilum*, una arqueobacteria termófila semejante a los micoplasmas. Corte fino. Su diámetro es de 0,25-5 µm; la mostrada aquí es de 1 µm. (b) Preparación sombreada de *Thermoplasma volcanium* aislado de manantiales calientes. Su diámetro es de 1-2 µm. Nótese la abundancia de flagelos.

Picrophilus

Un pariente filogenético de *Thermoplasma* y *Ferroplasma* es *Picrophilus*. Aunque *Thermoplasma* y *Ferroplasma* son acidófilos extremos, *Picrophilus* lo es incluso más, crecen óptimamente a pH de 0,7 y son capaces de crecer a valores de pH de ¡0,06! *Picrophilus* difiere de *Thermoplasma* y *Ferroplasma* en otros aspectos, como el hecho de que posee pared celular (capa S, Sección 4.13) y de que posee un DNA con valores más bajos de GC. En sulfataras en Japón se han aislado dos especies que crecen heterotróficamente sobre medios complejos. La fisiología de *Picrophilus* es claramente interesante como modelo de ácido-tolerancia. Los estudios de su membrana citoplasmática sugiere una distribución de sus lípidos muy inusual que la hacen resistir a pHs bajos; sin embargo a pH más moderados

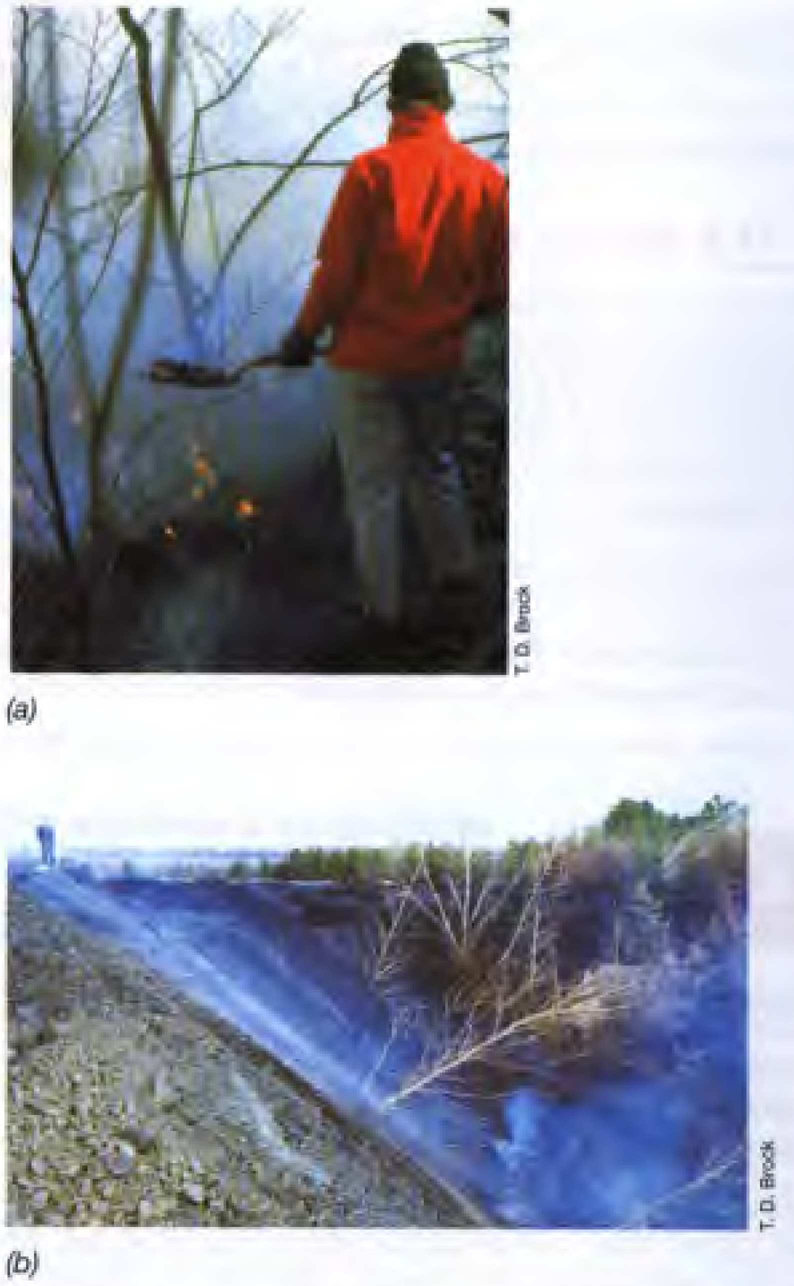


Figura 13.10 Pila de carbón autocombustible, hábitat de *Thermoplasma*. (a) La combustión espontánea puede quemar la vegetación aledaña. (b) Fotografía de varias de estas pilas de carbón.

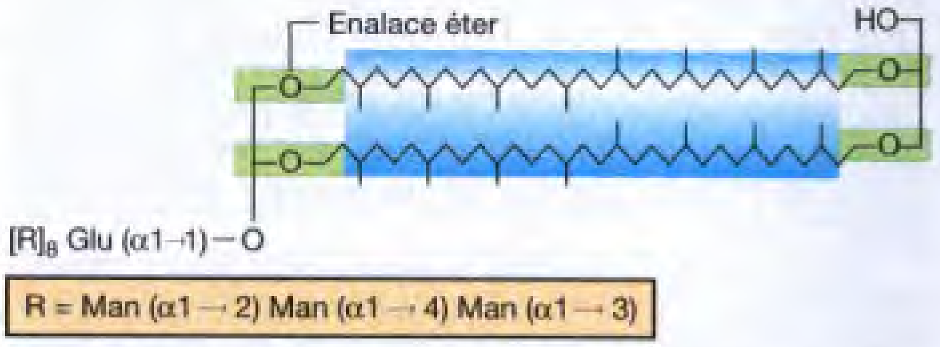


Figura 13.11 Estructura del lipoglicano de *Thermoplasma acidophilum*. Glu, Glucosa; Man, manosa. Nótense los enlaces éter (en verde) (compare con la Figura 4.20*b*).

(pH 4) las células de *Picrophilus* se vuelven porosas y literalmente se desintegran, lo cual indica claramente que este organismo ha evolucionado para sobrevivir en hábitat áltamente ácidos.

✓ 13.5 Revisión de conceptos

Thermoplasma, Ferroplasma y Picrophilus son termófilos acidófilos que forman su propio linaje filogenético dentro de *Archaea*, colonizando minas de pirita, carbón y en general hábitat ácidos así como solfataras volcánicas. Las células de *Thermoplasma* y de *Ferroplasma* carecen de pared celular y por ello se parecen a las micoplasmas.

- ✓ ¿En qué se parecen y en qué difieren *Thermoplasma y Picrophilus*?
- ✓ ¿Cómo refuerza *Thermoplasma* su membrana para sobrevivir en ausencia de pared celular?
- ✓ ¿Cómo obtiene *Ferroplasma* la energía para el crecimiento?

13.6 Euryarchaeota hipertermófilos: Thermococcales y *Methanopyrus*

Géneros clave

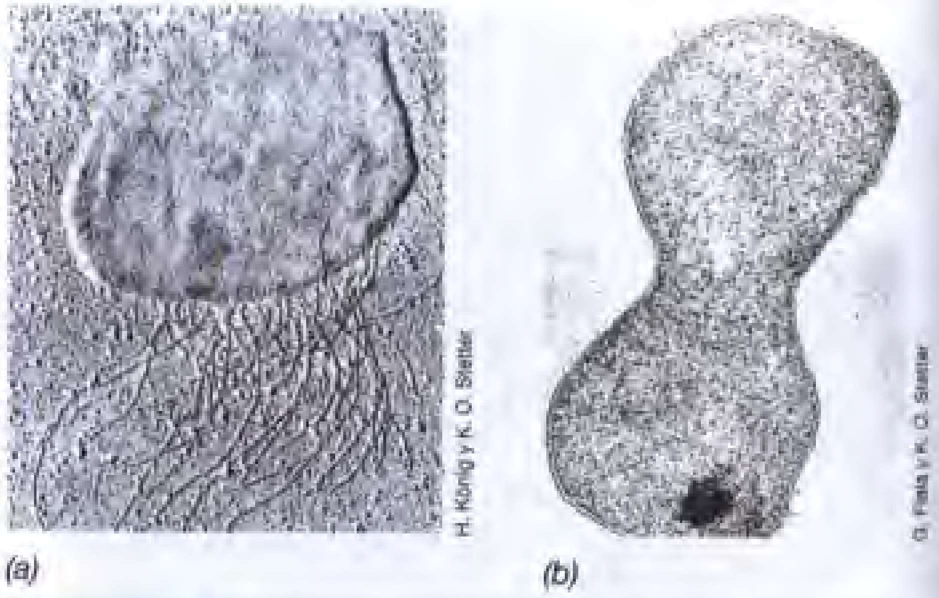
Thermococcus
Pyrococcus
Methanopyrus

Algunos Euryarchaeota crecen en ambientes termófilos e incluso algunos son extremadamente termófilos; los que crecen con temperaturas óptimas de 80°C o superiores se denominan *hipertermófilos*. Consideramos tres de estos organismos que se separan del árbol de las arqueas (Figura 13.1) en una zona próxima a la base. Dos de éstos, *Thermococcus y Pyrococcus* presentan características fenotípicas muy semejantes a las de los crenarchaeotas termofílicos que se verán en la Sección 13.8-13.10 y forman un orden distinto: los Thermococcales (*véase* Tabla 13.9). El otro, *Methanopyrus*, es un metanógeno muy próximo a los metanógenos (*véanse* Sección 13.4 y Tabla 13.5) en su fisiología más básica, pero es poco habitual en su termofilia extrema y por su posición filogenética, que es claramente diferente del resto de los metanógenos (Figura 13.1).

Thermococcus y Pyrococcus

Thermococcus es un euryarchaeota termofílico esférico, propio de ambientes anóxicos de aguas termales en muchas partes del mundo. Tienen un penacho de flagelos (Figura 13.12*a*). *Thermococcus* es anaerobio estricto y quimioorganotrofo que crece a expensas de proteínas u otras fuentes complejas (tal como muchos azúcares) y para ello utiliza el S^0 como aceptor de electrones y temperaturas entre 70-95°C.

Pyrococcus es semejante morfológicamente a *Thermococcus* (Figura 13.2*b*) *Pyrococcus* (etimológicamente deriva del latín, literalmente significa «bola de fuego»), pero difiere de él en que requiere temperaturas más altas para su crecimiento, llegando hasta los 106°C, estando el óptimo a 100°C. Desde el punto de vista metabólico, ambos son muy similares y así utilizan proteínas, almidón o maltosa que oxidan como fuente de electrones, utilizando el S^0 como aceptor terminal, que es por tanto reducido hasta ácido sulfídrico. Las Tablas 13.8 y 13.9 recogen más propiedades de *Thermococcus y Pyrococcus*.



H. König y K. O. Stetter

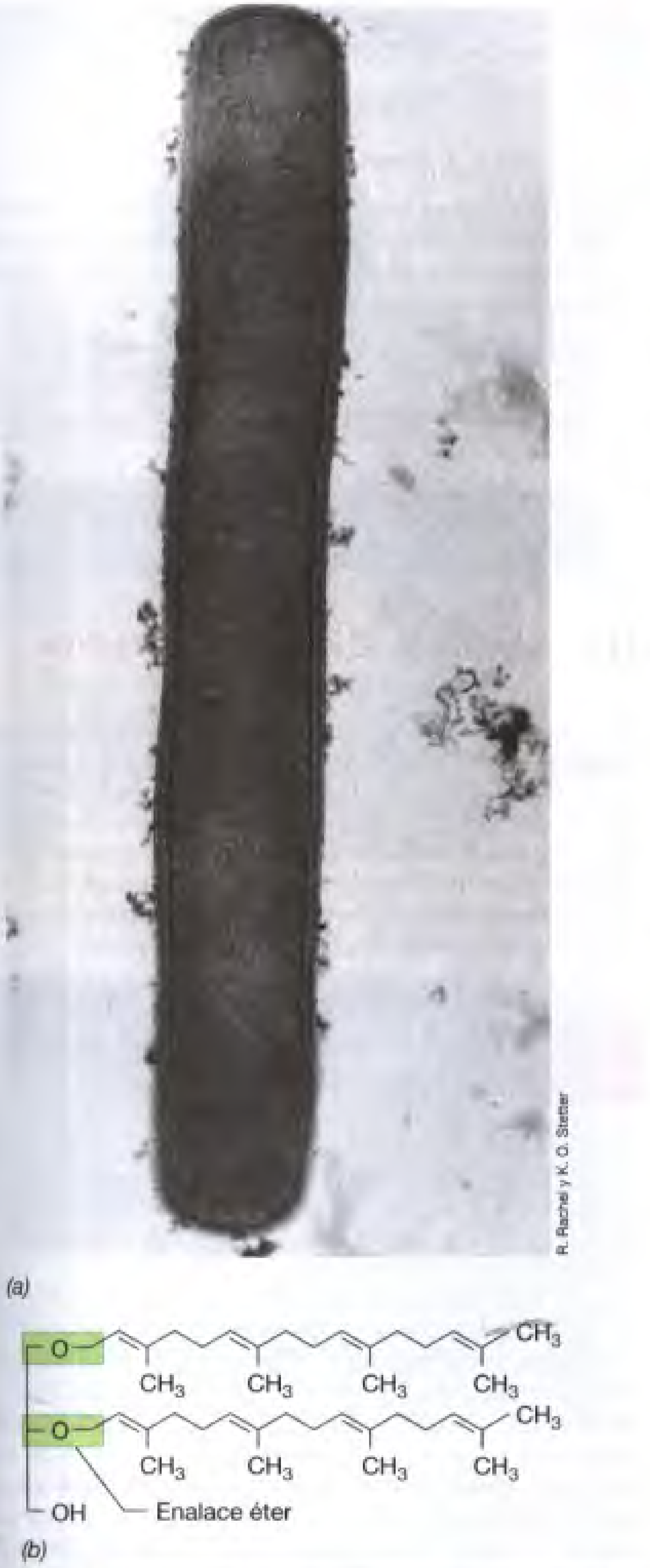
G. Fiala y K. O. Stetter

Figura 13.12 *Archaea* submarinas esféricas aisladas de zonas volcánicas. (a) *Thermococcus celer*. Micrografía de células sombreadas (nótese el penacho de flagelos). (b) División de *Pyrococcus furiosus*. Corte fino. Sus diámetros son de 0,8 µm.

Methanopyrococcus

Methanopyrococcus es un bacilo hipertermófilo que genera metano (Figura 13.13), que ha sido aislado de sedimentos submarinos y de chimeneas negras emisoras volcánicas submarinas (Sección 19.8). *Methanopyrus* ocupa un nicho filogenético único dentro del árbol de *Archaea*; es uno de los más antiguos de los microorganismos hipertermófilos y comparte características tanto con los hipertermófilos (máxima temperatura de crecimiento 110°C) como con los metanógenos (lleva a cabo la reacción $4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$).

Methanopyrus produce metano únicamente de $H_2 + CO_2$ y crece rápidamente con tiempos de generación inferiores a 1 hora y su temperatura óptima es 100°C. Al contrario que los metanógenos mesofílicos, tiene una gran cantidad de 2,3 difosfoglicerato cíclico disuelto en el citoplasma (concentración equivalente superior a 1 M), que se le supone elemento termoestabilizador de primera magnitud para prevenir la desnaturalización enzimática y del DNA a altas temperaturas (Sección 13.11). Contiene lípidos de membranas que no se encuentran en ninguna otra parte. Se trata de formas insaturadas de bifitanil éter (Figura 13.13*b*; Sección 4.5 y Figura 4.20). El descubrimiento de *Methanopyrus* puede explicar el origen de materiales como los hidrocarburos en los sedimentos oceánicos, que previamente se pensaba que eran demasiado calientes para que ocurriese en ellos la síntesis biogénica de metano. Además, a la profundidad a la que fue encontrado *Methanopyrus*, aproximadamente 2000 metros, el agua permanece en estado líquido hasta los 350°C. Esto sugiere que conforme se estudien más con detenimiento estos hábitat aparecerán otros microorganismos relacionados con *Methanopyrus* capaces de crecer a 110°C o a temperaturas más altas.



R. Rachel y K. O. Stetter

Figura 13.13 *Methanopyrus*. (a) Micrografia electrónica de *Methanopyrus kandleri*, el más termófilo de todos los metanógenos (límite superior de 110°C). Esta célula mide 0,5 × 8 µm. (b) Estructura de un nuevo lípido de *M. kandleri*. Estos lípidos son los normales en *Archaea* (véase Sección 4.5) con enlaces éter, excepto que en esta especie existen cadenas laterales insaturadas de *geranilgeraniol*. Se piensa que este lípido poco habitual se parece a los lípidos saturados fitanilo, y que *Methanopyrus* es, por tanto, un descendiente de un linaje muy antiguo de *Archea*; los datos de la Figura 13.1 apoyan esta hipótesis.

13.7 Euryarchaeota hipertermófilos: Los Archaeglobales

Géneros clave

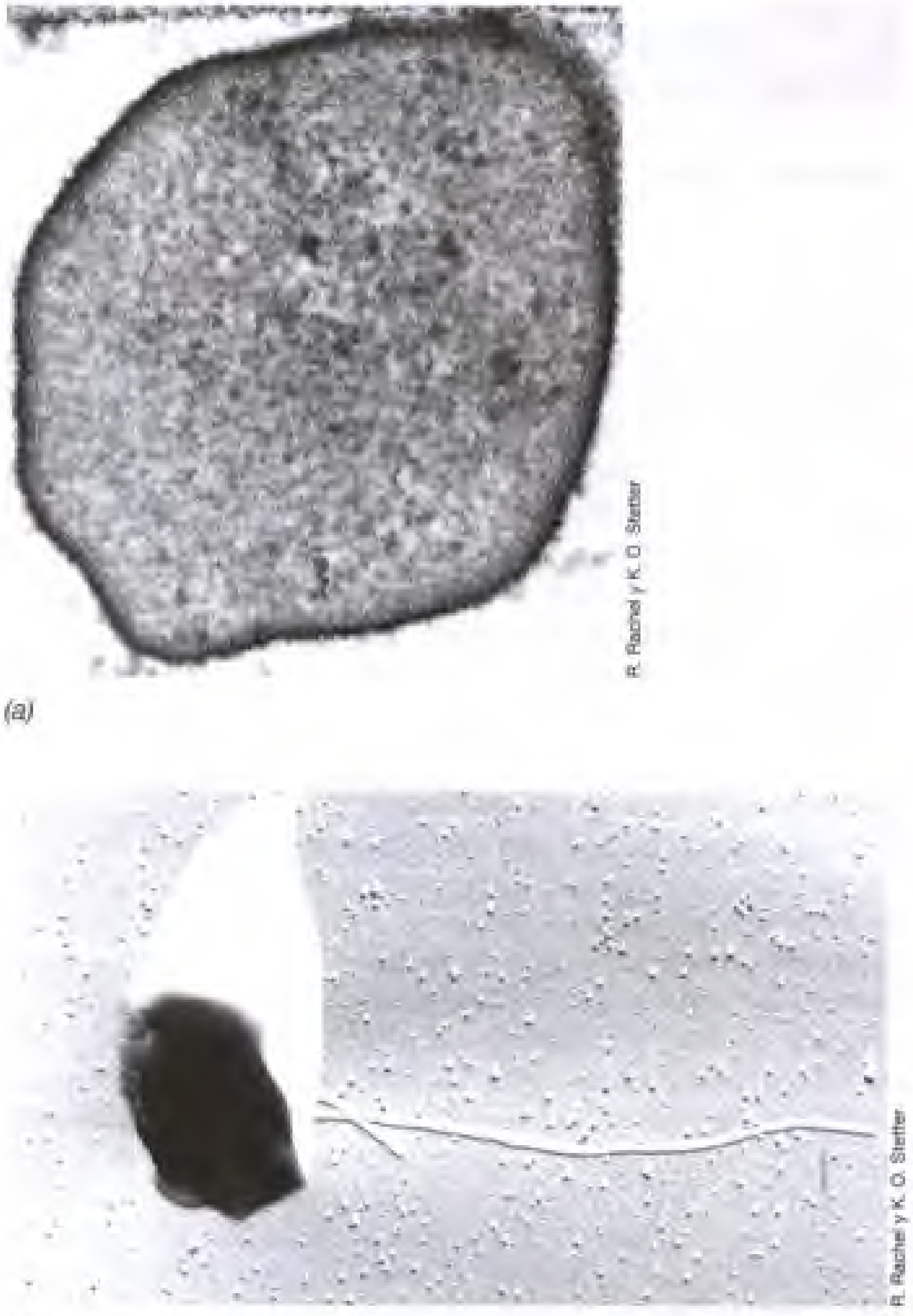
Archaeoglobus
Ferroglobus

Más adelante se verá que un número de Crenarchaeota hipertermofílicos llevan a cabo respiración anaeróbica en la que el S^0 se utiliza como aceptor de electrones siendo reducido hasta H_2S (*véase* Tabla 13.8). Curiosamente ninguno de estos microorganismos son *reductores de sulfato*, es decir, capces de reducir SO_4^{2-} a H_2S. Sin embargo un euryarchaeota hipertermófilo, *Archaeoglobus*, es un verdadero reductor de sulfato y forma un linaje filogenéticamente distinto dentro de los Euryarchaeota (Figura 13.1).

Archaeoglobus y su genoma

Archaeoglobus fue aislado de sedimentos marinos calientes cerca de una fuente hidrotermal y acopla la oxidación de hidrógeno, lactato, piruvato, glucosa o compuestos complejos orgánicos con la reducción de sulfato a sulfídrico. Las células de *Archaeoglobus* son cocos irregulares (Figura 13.14*a*) y crecen bien a 83°C. Sin embargo, una de las características más llamativas es su relación con los metanógenos. En el Capítulo 17 estudiaremos las propiedades bioquímicas únicas que se asocian con la metanogénesis. Brevemente, la metanogénesis implica el uso de cofactores nuevos para la bioquímica como es el coenzima F-420 o coenzima M, que solamente se han encontrado en los metanógenos (Sección 17.17). *Archaeoglobus* contiene trazas de estos coenzimas y sus cultivos producen pequeñas cantidades de este gas. Por tanto, *Archaeoglobus*, que también muestra una clara relación filogenética con los metanógenos (Figura 13.1), puede representar un tipo de organismo que sea una transición evolutiva entre los *Archaea*, que sea un puente entre los procesos de generación de energía por reducción de azufre y la metanogénesis.

Se ha obtenido información adicional sobre la metanogénesis en *Archaeoglobus* al concluir la secuenciación de su genoma. Ésta ha revelado que, aunque efectivamente puede producir metano, carece de un enzima clave para la metanogénesis como es el que codifica para la *metil-coM-reductasa* (Sección 17.17). Por ello, las pequeñas cantidades de metano que genera esta bacteria tiene un origen incierto. El genoma contiene 2400 genes, muchos de los cuales son análogos a los de las metanobacterias (*véase* Sección 13.4), pero sin embargo contiene genes que son únicos. Todo ello sugiere que la diversidad génica en *Archaea* es muy grande y probablemente se irá incrementando con los futuros descubrimientos, para llegar a ser algo parecido a lo que ocurre en *Bacteria* o incluso más: cada organismo nuevo que se secuencia posee aproximadamente la cuarta parte de sus genes que son únicos e irrepetibles, esto no se había observado nunca en otros organismos (Sección 15.3).



R. Rachel y K. O. Stetter

R. Rachel y K. O. Stetter

Figura 13.14 Archaeoglobales. (A) Micrografía de transmisión de hipertermófilo reductor de sulfato *Archaeoglobus fuligdis*. Su diámetro es de 0,7 µm. (B) Micrografía de criofractura de *Ferroglobus placidus* un hipertermófilo oxidante de ion ferroso y reductor de nitrato. Su diámetro es de 0,8 µm.

Ferroglobus

Ferroglobus (Figura 13.14*b*) está relacionado con *Archaeoglobus*, solo que no es capaz de reducir el sulfato. Es un quimiolitotrofo oxidante de hierro y obtiene su energía de la oxidación de ion ferroso a ion férrico acoplada a la reducción de nitrato a nitrito además de oxido nitroso (*véase* Tabla 13.8). *Ferroglobus* puede también utilizar hidrógeno o ácido sulfídrico como donadores de electrones en su metabolismo energético. *Ferroglobus* fue aislado en chimeneas hidrotermales submarinas y crece óptimamente a 85°C. Es interesante por diversas razones, pero especialmente porque esta oxidación férrica tiene lugar en ambientes anóxicos. Los mecanismos de generación de ion férrico en rocas primigenias, que hasta hace poco se pensaba habían sido generados por el oxígeno producido por cianobacterias (Sección 11.1), están siendo reexaminados en la actualidad después de ver las habilidades bioquímicas de *Ferroglobus* y bacterias fototróficas anoxigénicas (Sección 17.11), que pueden generar ion férrico en ausencia de oxígeno.

✓ 13.6-13.7 Revisión de conceptos

Los euryarchaeota hipertermófilos incluyen a los Thermococcales, Archaeoglobales y el género *Methanopyrus*. Todos los organismos de este grupo poseen temperaturas óptimas de crecimiento por encima de 80°C.

- ✓ ¿En qué difiere el metabolismo de *Thermococcus* del de *Methanopyrus?*
- ✓ ¿Qué euryarchaeota termofílico es un verdadero reductor de sulfato?
- ✓ ¿En qué difiere el metabolismo de *Ferroglobus* del de *Archaeoglobus?*

III PHYLUM CRENARCHAEOTA

Los Crenarchaeota son filogenéticamente diferentes de los Euryarchaeota y contienen organismos que viven en ambos extremos de la temperatura: agua hirviendo o hielo. La mayor parte de los cultivables son hipertermofílicos e incluso alguno presenta temperatura óptima superior a la del agua hirviendo. Empezaremos con una revisión de sus hábitat y metabolismo energético para posteriormente describir algunas propiedades de ciertos géneros.

13.8 Hábitat y metabolismo energético de los Crenarchaeotas

La Tabla 13.7 recoge un resumen de los principales hábitat de este grupo microbiano. Incluyen lugares muy calientes y muy fríos. La mayor parte de los *Archaea* hipertermófilos han sido aislados de suelos/aguas calentados por la actividad volcánica del planeta y ricos en azufre o sulfuros (Figura 13.15), de modo que muchas de las especies son capaces de metabolizar este elemento de una manera o de otra. En medios terrestres, manantiales ricos en azufre, barro hirviente y suelos de hasta 100°C pueden tener valor de pH muy ácido debido a la producción de ácido sulfúrico debida a la oxidación biológica del azufre o de los sulfuros (Secciones 17.10 y 19.13). A estos puntos se les conoce como **sulfataras** y se encuentran distribuidas por todo el mundo (Figura 13.15) como Italia, Islandia, Nueva Zelanda y el Parque Nacional de Yellowstone en Wyoming, USA. Dependiendo de los elementos geológicos circundantes, las sulfataras pueden ser ligeramente alcalinas o ligeramente ácidas, hasta extremadamente ácidas con valores de pH por debajo de 1. Los hipertermófilos pueden aislarse en cualquiera de estos pHs, aunque la mayoría tienen predilección por valores 5-8 de pH. Además de estos hábitat naturales, también se aíslan en obras del hombre como son las salidas de agua caliente de las plantas geotérmicas de producción de energía.

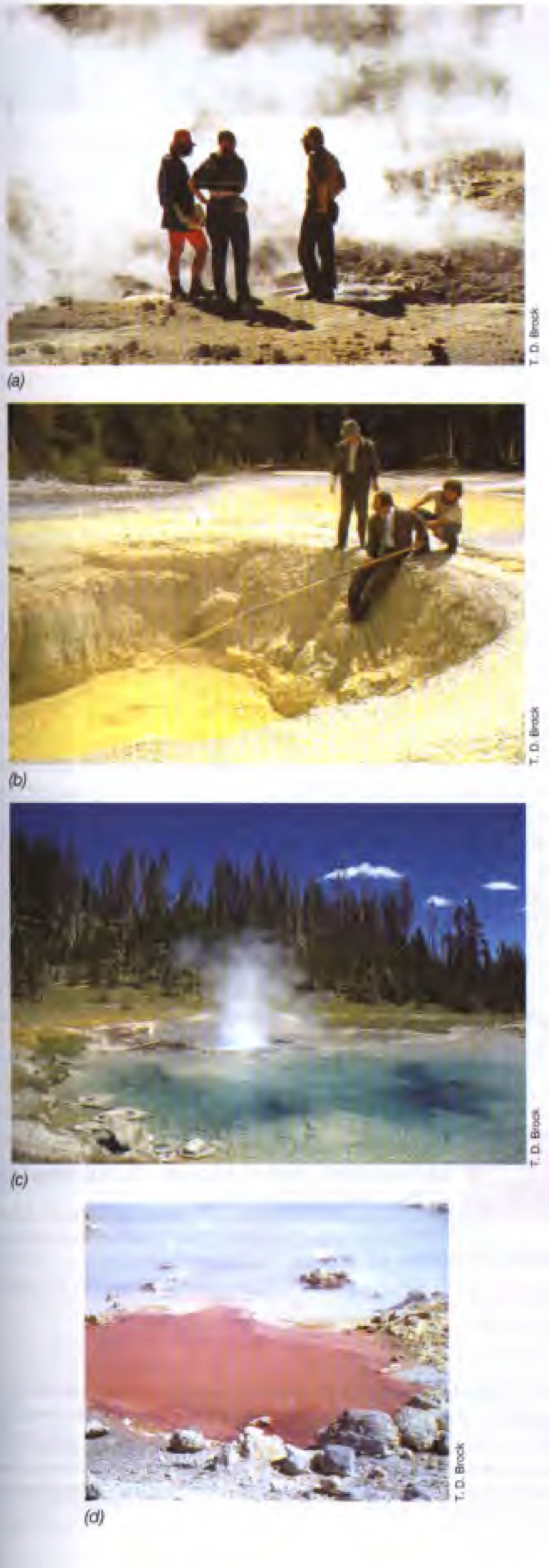


Figura 13.15 Hábitat de *Archaea* hipertermófilos. (a) Una sulfatara típica en el Parque Nacional de Yellowstone. Vapores ricos en ácido sulfídrico surgen desde el interior de la tierra. Debido al calor y a la acidez solamente prosperan microorganismos procarióticos. (b) Un manantial rico en azufre, hábitat de *Sulfolobus*. La acidez de estas sulfataras y manantiales viene de la oxidación de H_2S y S^0 hasta ácido sulfúrico por estos microorganismos. (c) Un típico manantial de agua hirviendo de pH neutro en el Parque Nacional de Yellowstone; Geiser Imperial. (d) Un manantial geotérmico de pH ácido y rico en hierro, otro hábitat de *Sulfolobus*. Aquí la oxidación de ion ferroso hasta férrico produce condiciones ácidas ($Fe^{3+} + 3H_2O \rightarrow Fe(OH)_3 + 3H^+$).

Crenarchaoetas hipertermófilos también se aíslan de ambientes submarinos en las fuentes *hidrotermales submarinas*. En la Sección 19.8 se discute en detalle la geología y microbiología de esos nichos en particular; aquí simplemente cabe indicar que a esas profundidades, el agua puede estar mucho más caliente que en la superficie debido al aumento de la presión que evita que entre en ebullición. De hecho, todos los hipertermófilos con temperaturas óptimas por encima de 100°C proceden de medios submarinos. Dichos medios submarinos pueden ser fuentes poco profundas (2-10 metros) como las que se encuentran en la costa de Vulcano, Italia, o fuentes hidrotermales profundas (2500-4000 metros) cerca de centros oceánicos (*véase* Sección 19.8). Estas últimas son los hábitat más calientes, conocidos hasta ahora, donde haya organismos vivos.

Crenarqueotas psicrófilos

A diferencia de los hipertermófilos, los crenarqueotas psicrófilos (Tabla 13.7) se han identificado en muestras de comunidades basado en secuencias del 16S rRNA a partir de ambientes no termales. Utilizando sondas filogenéticas fluorescentes (*véanse* Sección 11.6 y 18.4) se han encontrado crenarqueotas de este grupo por todos los mares del mundo (Figura 13.16*b*). A diferencia los hipertermófilos, estos psicrófilos han colonizado incluso las aguas antárticas (Figura 13.16*a*). Son planctónicos (esto es, suspendidos en el agua o unidos a partículas que están suspendidas en el agua) y se encuentran en número de 10^4/ml en aguas muy frías y con pocos nutrientes. Aunque su fisiología es todavía un misterio, el análisis de los lípidos muestra que tienen enlaces éter, prueba que son *Archaea* (Sección 4.5). La ecología de los crenarchaeotas marinos se discute en la Sección 19.6.

Metabolismo energético

Con unas pocas excepciones los crenarchaeotas hipertermofílicos son anaerobios estrictos. Su metabolismo energético puede ser o bien quimioorganotrofo o quimiolitotrofo (o ambos, como es el caso de *Sulfolobus*) e implica una amplia variedad de donadores y aceptores de electrones (Tabla 13.8). La fermentación es rara y la mayor parte de las estrategias bioenergéticas son respiraciones aerobias o anaerobias (Tabla 13.8). La conservación de la energía en estos procesos respiratorios tiene lugar por los mismos mecanismos generales que los vistos para *Bacteria*; es decir por transferencia electrónica en el seno de la membrana cito-

TABLA 13.7 Hábitat de los Crenarchaeota

Característica	Área termal[a]		Área no termal[b]
	Terrestre	Marina	
Localización	Sulfatara (manantiales calientes, fumarolas, lodo hirviendo); plantas de producción de energía geotérmicas; zonas profundas de la corteza terrestre	Manantiales calientes submarinos, sedimentos calientes y fuentes hidrotermales submarinas (chimeneas negras), reservorios profundos de petróleo	Plancton en océanos; aguas antárticas; hielos oceánicos; simbiontes de esponjas marinas
Temperatura	En superficie 100°C; subsuperficie, superiores a 100°C	Hasta 400°C	−2 hasta + 4°C
Salinidad/pH	Usualmente menor de 1% NaCl; pH 0,5-9	Moderada, 3% NaCl; pH 5-9	3-8% NaCl; pH 7-9
Gases y otros nutrientes	CO_2, CO, CH_4, H_2, H_2S, S^0, $S_2O_3^{2-}$, SO_4^{2-}, NH_4^+, N_2	Los mismos que los terrestres	CO_2,N_2, O_2; sustratos quimiolitotróficos como NH_4^+

[a] *Véase* Figuras 13.10 y 13.15 (Figuras 19.19-19.21).

[b] *Véase* Figura 13.16.

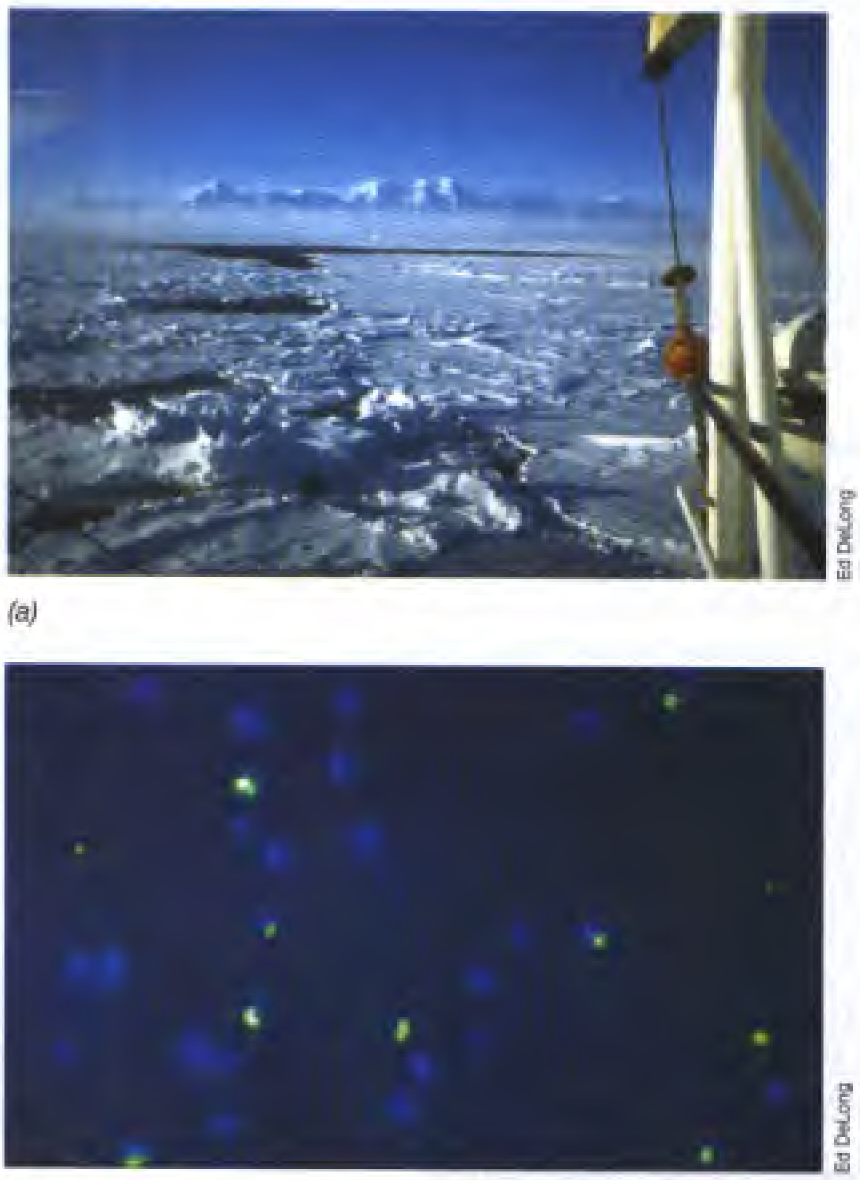


Figura 13.16 Crenarchaeota amantes del frío. (a) Fotografía de la península Antártica tomada desde cubierta. Las aguas heladas que se ven aquí son el hábitat preferido de los microorganismos sicrofílicos. (b) Micrografía de fluorescencia tratada con un colorante filogenético compuesto de fluoresceína unida a un oligonucleótido complementario a la región específica del 16S rRNA de Crenarchaeota (véase Sección 11.6 para la descripción de los métodos usados aquí). Las células azules están teñidas con DAPI (*véanse* Sección 18.3 y Figura 18.6). Las células teñidas de verde son Crenarchaeota psicrófilos. *Véanse* Sección 19.6 y Figura 19.13 para ver una descripción de *Bacteria* y *Archea* en el océano.

plasmática, que genera una fuerza motriz de protones que son translocados por la ATPasa que así genera el ATP (Sección 5.12).

Muchos crenarchaeotas hipertermófilos pueden crecer quimiolitotróficamente bajo condiciones anóxicas con H_2 como donador de electrones y S^0 o NO_3^- como aceptor de electrones; unos pocos pueden oxidar H_2 aeróbicamente (Tabla 13.8). La respiración de H_2 con ion férrico como aceptor electrónico también tiene lugar en diversos hipertermófilos. Otras formas de vida quimiolitotrofa incluyen la oxidación de azufre elemental a ion ferroso aeróbicamente, o este último anaeróbicamente con nitrato como aceptor de electrones (Tabla 13.8). Solamente se conoce un sulfato reductor de este grupo de hipertermófilos (*Archaeoglobus*). No se conocen fotosintéticos. La mayor temperatura a la que pueden crecer los microorganismos fotosintéticos descritos es de unos 70°C (Tabla 6.1) que es muy fría para los verdaderos hipertermófilos (*véase* Tabla 13.9).

Armados de un conocimiento básico de los hábitat y metabolismo energético pasemos ahora a describir los organismos más representativos.

13.9 Hipertermófilos de hábitat terrestres volcánicos: Sulfolobales y Thermoproteales

Géneros clave

Sulfolobus
Acidianus
Thermoproteus

Los hábitat volcánicos pueden tener temperaturas de hasta 100°C y por tanto aptos para el desarrollo de *Archaea* hipertermófilos. Dos de estos organismos, filogenéticamente relacionados, incluyen *Sulfolobus* y *Acidianus*. Estos géneros forman el corazón del orden Sulfolobales (Tabla 13.9).

TABLA 13.8 Reacciones productoras de energía en *Archaea* hipertermófilas

Clases nutricionales	Reacción energética	Tipo metabólico	Ejemplo
Quimioorganotrofo	Compuesto orgánico + $S^0 \rightarrow H_2S + CO_2$	AnR	*Thermoproteus, Thermococcus, Desulfurococcus, Thermofilum, Pyrococcus*
	Compuesto orgánico + $SO_4^{2-} \rightarrow H_2S + CO_2$	AnR	*Archaeoglobus*
	Compuesto orgánico + $O_2 \rightarrow H_2O + CO_2$	AeR	*Sulfolobus*
	Compuesto orgánico → $CO_2 + H_2$ + Ácidos grasos	F	*Staphylothermus, Pyrodictium*
	Piruvato → $CO_2 + H_2$ + acetato	F	*Pyrococcus*
Quimiolitotrofo	$H_2 + S^0 \rightarrow H_2S$	AnR	*Acidianus, Pyrodictium, Thermoproteus, Stygiolobus, Ignicoccus*
	$H_2 + NO_3^- \rightarrow NO_2^- + H_2O$ (NO_2^- reducido por algunas especies hasta N_2)	AnR	*Pyrobaculum*
	$4\,H_2 + NO_3^- + H^+ \rightarrow NH_4^+ + 2\,H_2O + OH^-$	AnR	*Pyrolobus*
	$H_2 + 2\,Fe^{3+} \rightarrow 2\,Fe^{2+} + 2\,H^+$	AnR	*Pyrobaculum, Pyrodictium, Archaeoglobus*
	$2\,H_2 + O_2 \rightarrow 2\,H_2O$	AeR	*Acidianus, Sulfolobus, Pyrobaculum*
	$2\,S^0 + 3\,O_2 + 2\,H_2O \rightarrow 2\,H_2SO_4$	AeR	*Sulfolobus, Acidianus*
	$2\,FeS_2 + 7\,O_2 + 2\,H_2O \rightarrow 2\,FeSO_4 + 2\,H_2SO_4$	AeR	*Sulfolobus, Acidianus, Metallosphaera*
	$2\,FeCO_3 + NO_3^- + 6\,H_2O \rightarrow 2\,Fe(OH)_3 + NO_2^- + 2\,HCO_3^- + 2\,H^+ + H_2O$	AnR	*Ferroglobus*
	$4\,H_2 + SO_4^{2-} + 2\,H^+ \rightarrow 4\,H_2O + H_2S$	AnR	*Archaeoglobus*
	$4\,H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2\,H_2O$	AnR	*Methanopyrus, Methanocaldococcus, Methanothermus*

[a] AnR, respiración anaeróbica; AeR, respiración aeróbica; F, fermentación

Sulfolobales

Sulfolobus crece en manantiales calientes ricos en azufre (Figura 13.15*b*) a temperaturas de hasta 90°C y pHs de 1-5[*]; es un quimiolitotrofo aeróbico que oxida ácido sulfídrico o azufre elemental hasta ácido sulfúrico y además fija anhídrido carbónico. También puede crecer quimioorganotróficamente. Las células son más o menos esféricas pero con lóbulos bien marcados (Figura 13.17*a*). Se adhieren fuertemente a cristales de azufre, donde se les puede ver si usamos sondas fluorescentes (Figura 17.26*b*). Además de respirar aeróbicamente azufre o compuestos orgánicos, *Sulfolobus* puede también oxidar ion ferroso a ion férrico, lo que ha sido aplicado en la minería de menas de hierro y cobre (Sección 19.16).

Un anaerobio facultativo que se asemeja a *Sulfolobus* y que vive en sulfataras ácidas, denominado *Acidianus* (Figura 13.17*b*) difiere de *Sulfolobus* en su capacidad de crecer anaeróbicamente. Puede utilizar el azufre (S^0) tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. En aerobiosis el organismo utiliza el azufre elemental (S^0) como *donador* de electrones, oxidándolo hasta sulfúrico (H_2SO_4); en anaerobiosis utiliza el S^0 como *aceptor* de electrones (utilizando hidrógeno como donador de electrones), con lo que se genera sulfídrico (H_2S). Por tanto el destino metabólico del azufre (S^0) cuando *Acidianus* está presente, depende de que exista oxígeno o no en ese momento. Como *Sulfolobus, Acidianus* casi esférico pero no lobulado (Figura 13.17*b*). Crece a temperaturas entre 65 y 95°C con un óptimo a 90°C.

Thermoproteales

Los géneros *Thermoproteus* y *Thermophilum* poseen células bacilares que habitan manantiales calientes neutros o ligeramente ácidos. Las células del primero son bacilos rígidos de 0,5 μm de diámetro y de longitud muy variable desde 1-2 μm hasta 70-80 μm de largo (Figura 13.18*a*). Los filamentos de *Thermophilum* son más finos, algunos de 0,17-0,35 μm de ancho con longitudes de hasta 100 μm (Figura 13.18*b*).

Ambos géneros son anaerobios estrictos que llevan a cabo una respiración anaerobia basada en el azufre. Al contrario que la mayoría de los hipertermófilos son muy sensibles al oxígeno y comparable a la de los metanógenos (*véase* Sección 13.4); por ello se deben manejar con mucho cuidado para evitar su muerte. La mayoría de los aislados de *Thermoproteus* pueden crecer quimiolitotróficamente sobre hidrógeno o quimioorganotróficamente sobre sustratos complejos tales como extracto de levadura, almidón, glucosa, etanol, malato, fumarato o formato (*véase* Tabla 13.8). Ambos géneros tienen valores similares de

---

[*] Nota histórica: *Sulfolobus* fue descubierto por vez primera por Thomas Brock y colaboradores en 1970 y formalmente descrito en 1972. El descubrimiento de *Sulfolobus* junto con el de *Thermus aquaticus* (fuente de la *Taq* DNA polimerasa termoestable, Sección 10.17) acredita la apertura del campo de la microbiología de hipertermófilos. Thomas Brock fue el autor senior de las 7 ediciones anteriores de esta obra. En los ochenta y hasta el presente, Kart Stetter y colaboradores en Alemania han abierto considerablemente el campo de la microbiología hipertermofílica con el descubrimiento de muchos géneros y especies nuevas.

TABLA 13.9 Propiedades de Crenarchaeotas hipertermófilos

Grupo/Género[a]	Morfología	Número de especies	Relación con el oxígeno[b]	DNA (GC mol %)	Temperatura(°C)			pH óptimo
					Mínima	Óptima	Máxima	
Sulfolobales								
Sulfolobus	Cocos lobulados	6	Ae	37	55	75	87	2-3
Acidianus	Cocos	3	Fac	31	60	88	95	2
Metallosphaera	Cocos	2	Ae	45	50	75	80	2
Stygiolobus	Cocos lobulados	1	An	38	57	80	89	3
Aeropyrum	Cocos	1	Ae	56	70	95	100	7
Stetteria	Cocos	1	An	65	68	95	102	6
Sulfophobococcus	Discos	1	An	54-56	70	85	95	7.5
Thermosphaera	Cocos	1	An	46	67	85	90	7
Thermoproteales								
Thermoproteus	Bacilos	2	An	56	60	88	96	6
Thermophilum	Bacilos	1	An	57	70	88	95	5.5
Pyrobaculum	Bacilos	3	Fac	46	74	100	102	6
Caldivirga	Bacilos	1	An	43	60	85	92	4
Thermocladium	Bacilos	1	An	52	60	75	80	4.2
Desulfurococcales								
Desulfurococcus	Cocos	2	An	51	70	85	95	6
Staphylothermus	Cocos en racimos	1	An	35	65	92	98	6-7
Pyrodictium	Discos con filamentos	3	An	62	82	105	110	6
Pyrolobus	Cocos lobulados	1	Fac	53	90	106	113	5.5
Thermodiscus	Discos	1	An	49	75	90	98	5.5
Ignicoccus	Cocos irregulares	2	An	35	65	90	103	5
Hyperthermus	Cocos irregulares	1	An	56	75	102	108	7
Sulfurisphaera	Cocos	1	Fac	33	63	84	92	2
Sulfurococcus	Cocos	2	Ae	43-46	40	75	85	2.5
Archaeoglobales[c]								
Archaeoglobus	Cocos	3	An	46	64	83	95	7
Ferroglobus	Cocos irregulares	1	An	43	65	85	95	7
Thermococcales[c]								
Thermococcus	Cocos	14	An	38-57	70	88	98	6-7
Pyrococcus	Cocos	4	An	38	70	100	106	6-8

[a] El nombre acabado en «ales» representa orden (Sección 11.10).

[b] Ae, aerobio; An, anaerobio; Fac, facultativo.

[c] Filogenéticamente los géneros de este orden de hipertermófilos son miembros de los Euryarchaeota (*véanse* Secciones 13.6 y 13.7).

GC (56-58% GC) pero son filogenéticamente distintos (Sección 11.9).

13.10 Hipertermófilos de hábitat volcánicos submarinos: Desulfurococcales

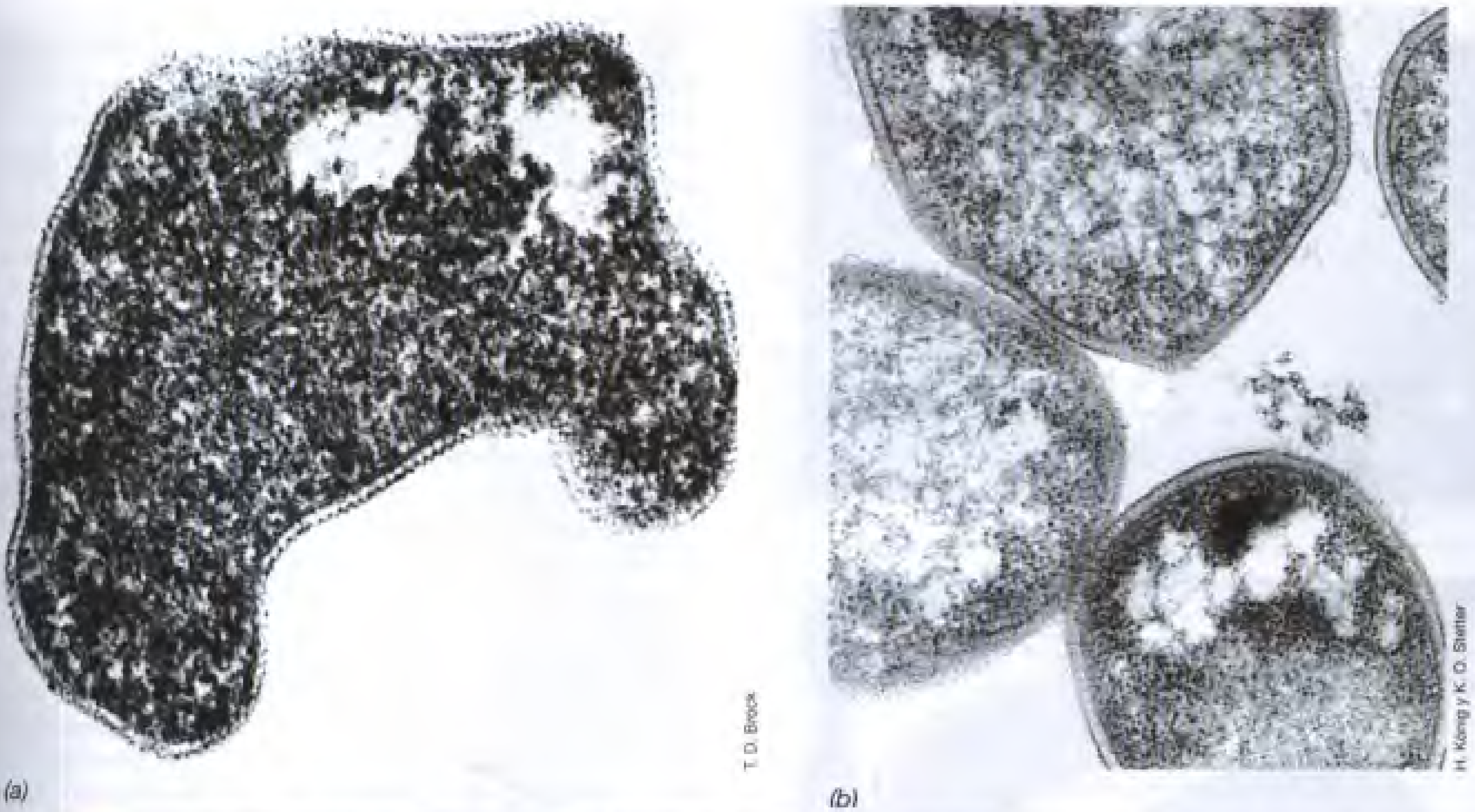
Géneros clave

Pyrodictium
Pyrolobus
Ignicoccus
Staphylothermus

A continuación veremos la microbiología de hábitat volcánicos *submarinos*, donde habitan los más hipertermófilos de todos los *Archaea* conocidos. Estos hábitat incluyen manantiales calientes de aguas poco profundas hasta afloraciones hidrotermales en zonas abisales oceánicas. En la Sección 19.8 se discuten los aspectos geológicos de estos fascinantes hábitat microbianos. Taxonómicamente estos organismos se agrupan a nivel de orden como Desulfurococcales (Tabla 13.9).

Pyrodictium y *Pyrolobus*

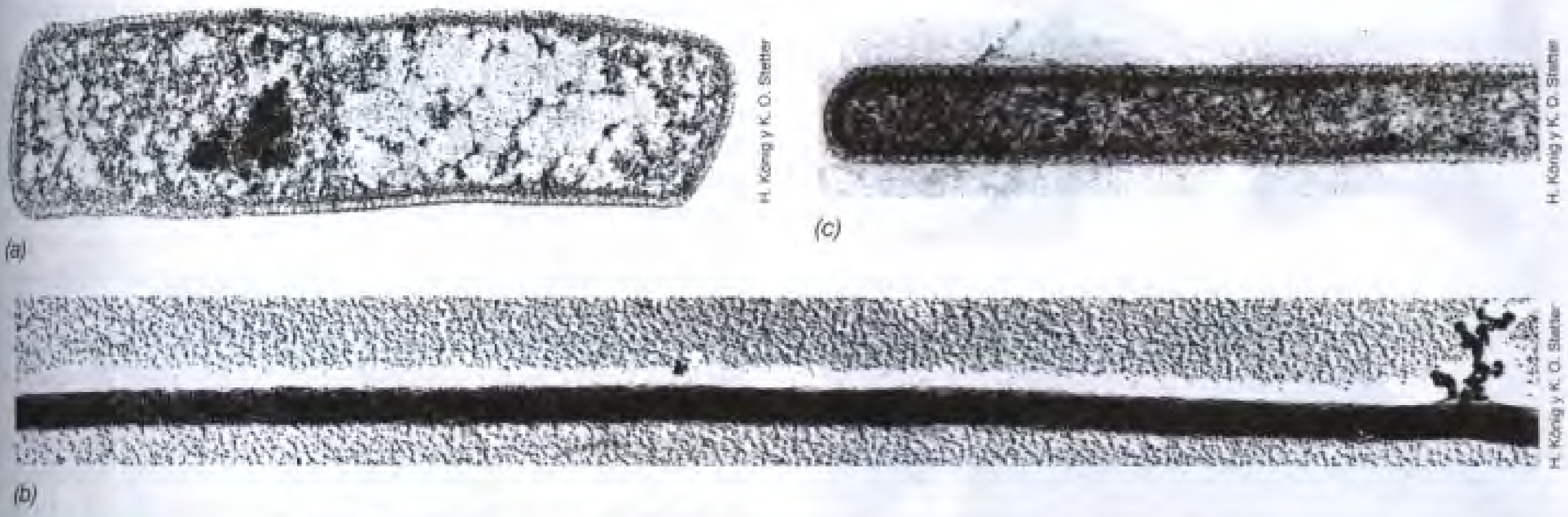
Pyrodictium, *Pyrolobus* y *Pyrobaculum* son interesantes ejemplos de procariotas cuyas temperaturas óptimas de crecimiento están (o son superiores) sobre los 100°C. Así la óptima de *Pyrodictium* es de 105°C y un grado más para *Pyrolobus*. Las células de *Pyrodictium* son discos irregulares que crecen como si fuesen un micelio sobre cristales de azufre elemental (Figura 13.19 *a*, *b*). La masa tiene una serie de fibras que están huecas y formadas por un tipo de



T. D. Brock

H. König y K. O. Stetter

Figura 13.17 *Archaea* acidófilas e hipertermofílicas, las Sulfolobales. (a) *Sulfolobus acidocaldarius*; Corte fino. (b) *Acidianus infernus*. Corte fino. El diámetro de ambos oscila entre 0,8 y 2 µm.



H. König y K. O. Stetter

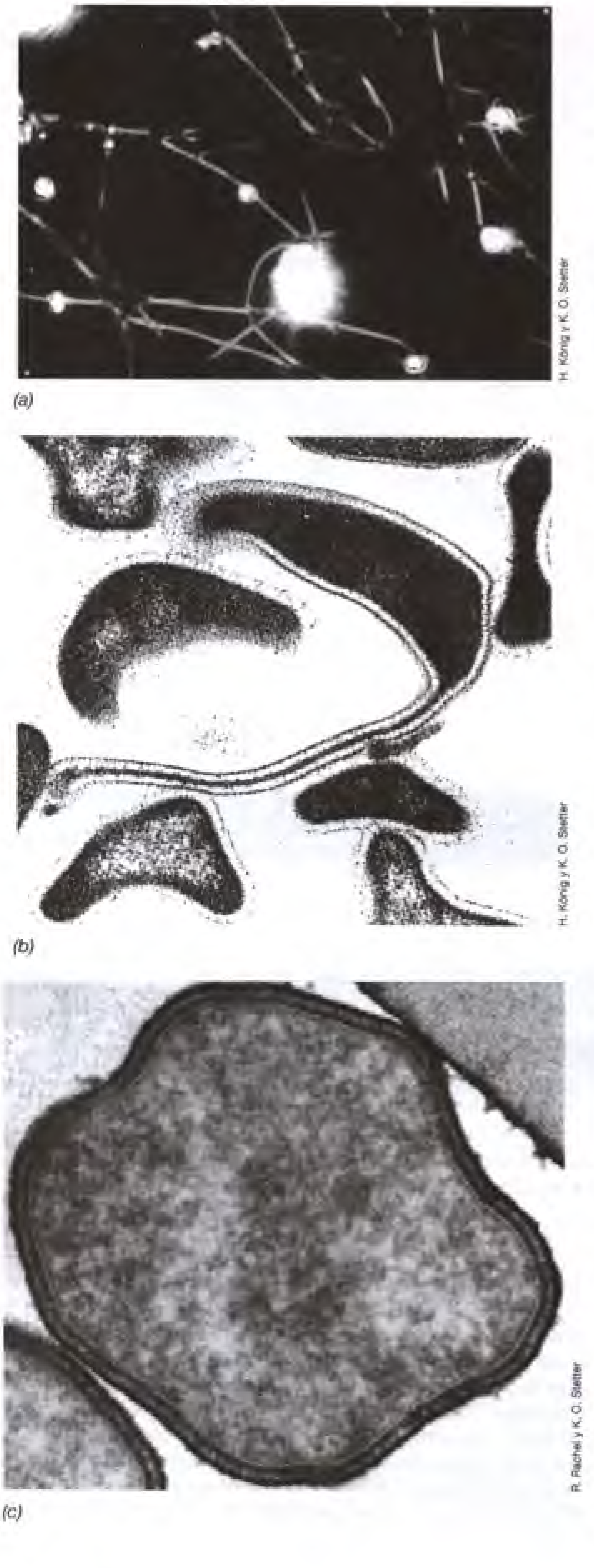
H. König y K. O. Stetter

H. König y K. O. Stetter

Figura 13.18 *Archaea* bacilares hipertermófilas, las Thermoplasmatales. (a) *Thermoproteus neutrophilus*. Micrografía electrónica de un corte fino. El diámetro es de 0,5 µm. (b) *Thermophilum librum*. Su célula observada por la técnica del sombreado, solamente tiene 0,25 µm de diámetro. (c) *Thermophilum librum*. Micrografía electrónica de un corte fino.

proteína dispuesta helicoidalmente como ocurre en los flagelos (Sección 4.10). Estas fibras son en la práctica el órgano de fijación a las superficies (*véase* Figura 13.22); las paredes celulares están formadas por glicoproteínas. Fisiológicamente es un anaerobio estricto que crece quimiolitotróficamente sobre hidrógeno utilizando el azufre elemental como aceptor de electrones; también puede crecer quimioorganotróficamente sobre sustratos complejos orgánicos (*véase* Tabla 13.8).

Pyrolobus fumari (Figura 13.19*c*) tiene el record de la temperatura más alta, ya que puede crecer hasta los 113°C y no puede hacerlo por debajo de 90°C. Vive en las paredes de las fuentes hidrotermales submarinas (Sección 19.8 y Figura 19.20) donde, y utilizando sus capacidades autotróficas, son una fuente de producción primaria de biomasa en un medio totalmente inorgánico. Sus células son cocoides (Figura 13.19*c*) y la pared celular está formada de proteína, es un quimiolitotrofo obligado creciendo a



H. König y K. O. Stetter

H. König y K. O. Stetter

R. Rachel y K. O. Stetter

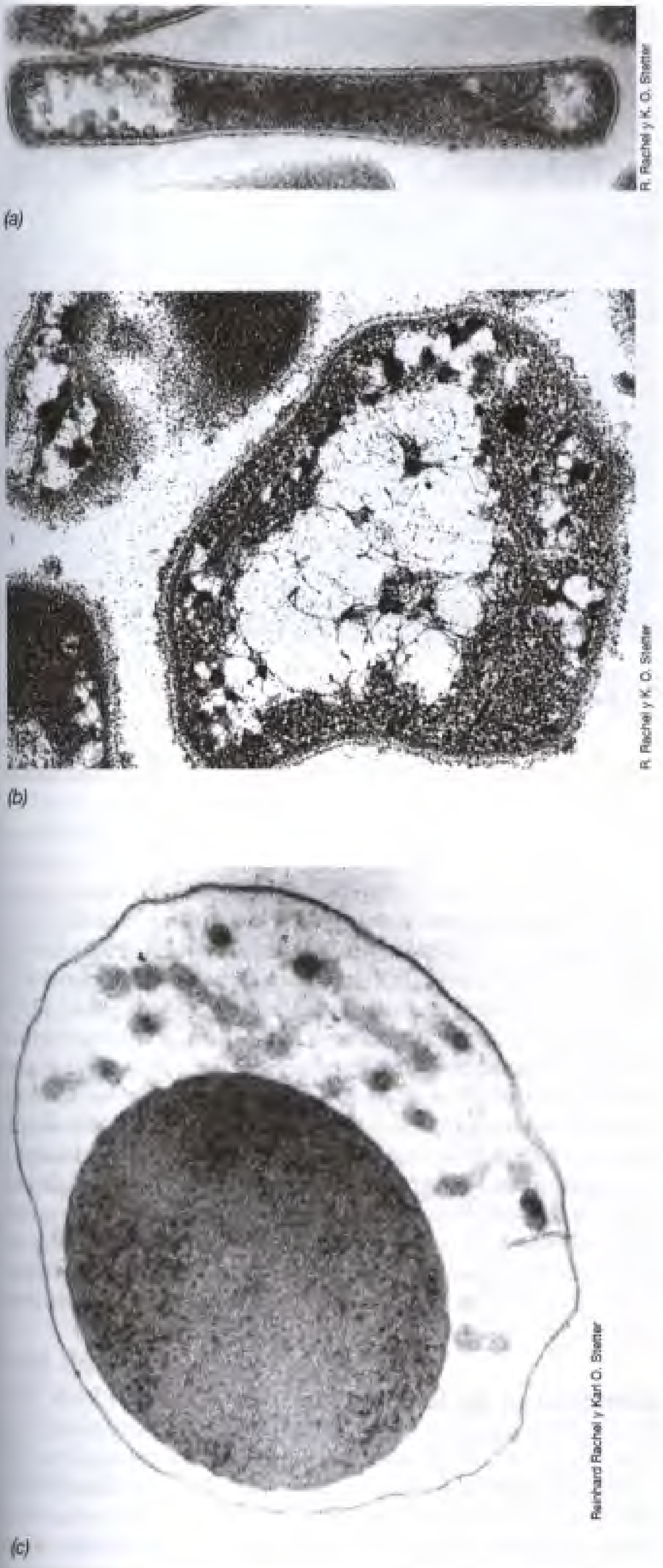
Figura 13.19 Desulfurococcales con temperatura óptima > 100 °C. (a) *Pyrodictium occultum* (temperatura óptima de crecimiento, 105 °C), campo oscuro. (b) Corte fino de *P. Occultum*. Las células presentan un diámetro muy variable de 0,3 a 2,5 µm. (c) Corte fino de *Pyrolobus fumarii*, el más termofílico de todos los procariotas conocidos (temperatura óptima, 106°C); diámetro de 1,4 µm.

expensas de la oxidación de hidrógeno acoplada a la reducción de nitrato hasta amoníaco o de tiosulfato hasta sulfídrico o incluso muy bajas proporciones de oxígeno, con lo que se forma agua. *Pyrolobus* resiste temperaturas muy por encima de la temperatura óptima y así sobrevive autoclavado a 121°C durante 1 h, una condición que ni siquiera soportan las endosporas bacterianas (Sección 4.15). Teniendo en cuenta el hábitat de este microorganismo, las fuentes hidrotermales submarinas, donde ocurren frecuentemente cambios de termperaturas, la elevada termorresistencia tiene un gran valor adaptativo por la supervivencia.

Desulfurococcus, *Ignicoccus* y *Pyrobaculum*

Otros miembros notables de este grupo de hipertermófilos incluyen *Desulfurococcus*, género que da nombre al orden Desulforococcales(Figura 13.20*b*). *Desulfurococcus* es un anaerobio estricto reductor de azufre elemental como *Pyrodictium*, pero difiriendo de él en que es mucho menos termofílico, pues su temperatura óptima ronda los 85°C. *Pyrobaculum* (Figura 13.20*a*) es fisiológicamente único, ya que algunas especies pueden respirar tanto aeróbica como anaeróbicamente con nitrato, ion férrico o azufre elemental, como aceptores de electrones e hidrógeno como donador universal; otras especies crecen en anaerobiosis sobre donadores orgánicos de electrones y reduciendo el azufre hasta sulfídrico. La temperatura óptima de crecimiento es la de ebullición del agua a nivel del mar y se han aislado especies de *Pyrobaculum* tanto de manantiales calientes de medios terrestres como de zonas profundas submarinas.

Ignicoccus (Figura 13.20*c*) es un hipertermófilo nuevo que parece contener una «membrana externa» verdadera semejante a la membrana externa presente en *Bacteria* (*véase* Sección 4.9). La membrana externa de *Ignicoccus* es poco habitual, en el sentido de que se forma a cierta distancia del citoplasma de la célula, lo que genera un espacio periplásmico muy grande (Figura 13.20*c*). De hecho, el *periplasma* de *Ignicoccus* es de dos a tres veces más grande que el citoplasma, claramente en contraste con lo que ocurre en *Bacteria* Gram negativas, donde el periplasma representa el 25% del citoplasma. El periplasma de *Ignicoccus* también contiene vesículas rodeadas por unidad de membrana (Figura 13.20*c*) que pueden funcionar exportando sustancias al exterior de la célula. *Ignicoccus* crece óptimamente a 90°C y su metabolismo se basa en el hidrógeno y azufre(H_2/S^0), como es el caso de muchas *Archaea* hipertermófilas (Tabla 13.8). La función de este periplasma tan inusual no está clara y se necesitan estudios químicos de la membrana externa para determinar si contiene componentes lipopolisacarídicos semejantes a los de *Bacteria* (Sección 4.9). Sin embargo, y con independencia de lo



R. Rachel y K. O. Stetter

R. Rachel y K. O. Stetter

Reinhard Rachel y Karl O. Stetter

Figura 13.20 Ejemplos de Desulfurococcales con temperaturas óptimas de crecimiento por debajo de 100°C. (a) Corte fino de *Pyrobaculum aerophilum;* 0,5 × 3,5 µm. (b) Corte fino de *Desulfurococcus saccharovorans*; diámetro 0,7 µm. (c) Corte fino de *Ignicoccus islandicus*. La célula posee un periplasma muy desarrollado; en sí misma mide 1µm de diámetro pero el periplasma mide 1,4 µm.

que indiquen los mencionados estudios, *Ignicoccus* sobresale como único por su estructura dentro de los *Archaea* hipertermófilos y por supuesto dentro de todos los procariotas conocidos.

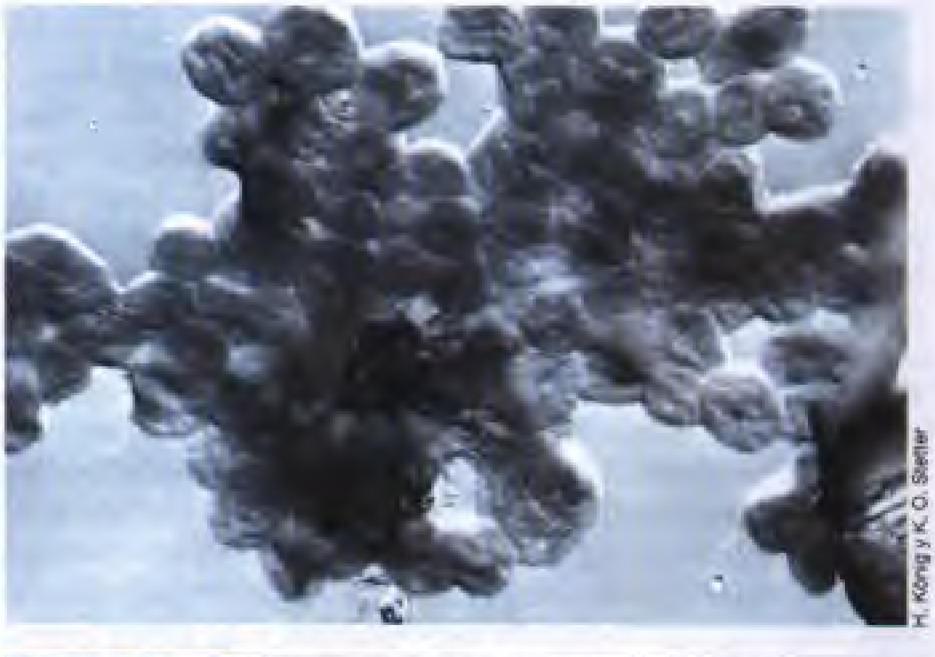
Staphylothermus

Un miembro morfológicamente poco habitual de los Desulforococcales es el género *Staphylothermus*. Sus células son esféricas, de alrededor de 1 μm de diámetro y que forma agregados de hasta 100 células, lo que recuerda al género *Staphylococcus* (comparar la Figura 13.21 con la 4.4b). *Staphylothermus* es un quimioorganotrofo, que crece óptimamente a 92°C; obtiene la energía de la fermentación de péptidos originando ácidos grasos como acetato e isovalerato (Tabla 13.8). Se han obtenido aislamientos de este género tanto en aguas poco profundas como en las chimeneas negras de las fuentes hidrotermales submarinas de zonas muy profundas, lo que indica que este organismo está muy distribuido en ambientes térmicos submarinos y que debe de ser un gran consumidor de material proteico en estos ambientes.

✓ *13.8-13.10 Revisión de conceptos*

Los Crenarchaeota hipertermófilos habitan los lugares más calientes de la Tierra donde puede haber vida. También se concen especies psicrófilas filogenéticamente relacionadas con esots microorganismos. Se conocen diversos tipos morfológicos de Crenarchaeota así como modos diferentes de metabolismo.

- ✓ ¿Cuáles son las principales diferencias entre *Sulfolobus* y *Pyrolobus*? ¿y *Staphylothermus* e *Ignicoccus*?
- ✓ ¿Qué es único o poco habitual en las propiedades metabólicas del género *Acidianus*, en relación con el azufre elemental (S^0)?
- ✓ ¿Qué clase de organismos son, desde el punto de vista de la energía, aquellos que utilizan el hidrógeno como donador de electrones? ¿Qué Crenarchaeota utiliza el H_2?¿Qué utilizan como aceptores de electrones?



H. König y K. O. Stetter

Figura 13.21 Micrografía del hipertermófilo *Staphylothermus marinus* (crecimiento óptimo a 92°C). Observación por sombreado. Diámetro de 1 µm.

IV EVOLUCION Y VIDA A ALTAS TEMPERATURAS

Los *Archaea* hipertermófilos crecen a temperaturas mucho más altas que el resto de los procariotas. ¿Qué hace que esto sea así y cuáles son los límites más allá de los cuales la vida se hace imposible? ¿Qué nos dicen los procariotas hipertermófilos sobre la historia inicial de la Tierra? A continuación examinaremos y trataremos de contestar estas preguntas.

13.11 Estabilidad térmica de las biomoléculas

La estabilidad de las proteínas y del DNA de los hipertermófilos es crítica para su supervivencia a altas temperaturas. La mayoría de las proteínas se inactivan a altas temperaturas; por ello se han realizado exhaustivas investigaciones sobre una gran cantidad de proteínas purificadas de hipertermófilos. La composición de aminoácidos de estas proteínas no nos indica nada inusual. De hecho muy a menudo tienen las mismas características estructurales que sus equivalentes de bacterias mesófilas. Sin embargo hay que indicar que las proteínas termofílicas tienden a tener núcleos hidrofóbicos, que probablemente dan más estabilidad intrínseca a la proteína. En definitiva es el plegamiento lo que da una característica de termoresistencia, por ello cambios aparentemente tan sencillo como cambiar un aminoácido por otro (influenciando el plegamiento) son suficientes como para transformar una proteína en termoresistente. Como todas las células los hipertermófilos producen *chaperoninas* (proteínas de choque térmico, Sección 7.16) que funcionan para reconfigurar, al menos parcialmente, proteínas desnaturalizadas. En células de *Pyrodiction* (Figura 13.22), la chaperonina más importante se denomina el *termosoma*. Su misión es mantener las proteínas en una conformación activa y de hecho, por sí misma, puede incrementar la tasa de resistencia celular a la temperatura; cuando el termosoma está presente, las células de *Pyrodiction* pueden sobrevivir 1 h en el autoclave (121°C).

Estabilidad del DNA

¿Cómo se mantiene intacto el DNA a altas temperaturas y no se separan sus dos hebras monocatenarias? Hay diversos mecanismos implicados. El citoplasma de metanógenos hipertermófilos contiene grandes cantidades 2,3-difosfoglicerato potásico cíclico. Este soluto evita el daño químico, como la depurinización del DNA, que puede ocurrir a altas temperaturas. Sin embargo no todos los hipertermófilos lo producen; pero se sospecha que también exixten otros mecanismos que estabilizan el DNA. Todos los hipertermófilos producen una forma particular de DNA topoisomerasa denominada *girasa reversa de DNA* (Sección 7.3), que introduce vueltas *positivas* en el DNA (en claro contraste con las *negativas* que introduce la DNA girasa «normal») y se ha constatado que el enrollamiento positivo estabiliza el DNA y lo hace resistente a la desnaturalización térmica.

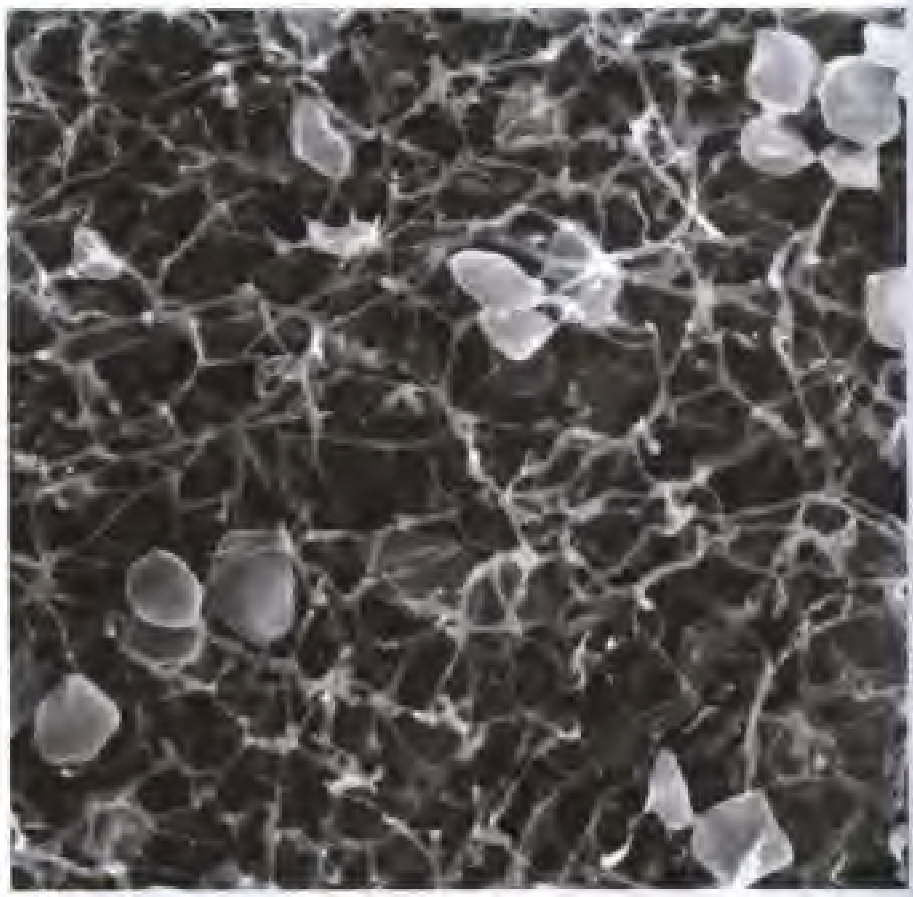

G. Rieger, R. Hermann, R. Rachel, K.O. Stetter

Figura 13.22 Micrografía electrónica de barrido de *Pyrodictium abyssi*. Se ha utilizado como modelo para estudiar la estabilidad de las macromoléculas a altas temperaturas. Las células están embebidas en una matriz espesa de glicoproteínas que las mantiene unidas.

Además de sales y la DNA girasa, existen otras proteínas implicadas en el mantenimiento del dúplex de DNA. Por ejemplo en *Sulfolobus* se ha visto una pequeña proteína (*Sac7d*) que se une al surco menor del DNA de manera no específica aumentando la temperatura de fusión del DNA en unos 40°C. Esta proteína puede también estar implicada en la regulación génica (*véase* Sección 8.4). Aunque este tipo de proteínas está limitado al mundo de los Crenarchaeota, los Euryarchaeota también contienen proteínas que se unen fuertemente al DNA; son de naturaleza básica y sus secuencias recuerdan claramente a las histonas de *Eukarya*. Estas *histonas* de *arqueas* han sido particularmente bien estudiadas en *Methanothermus fervidus* ya que forman quasi-nucleosomas en su DNA (Figura 13.23) (*véase* Sección 7.3) y lo mantienen en su forma dúplex a muy altas temperaturas.

Estabilidad de los lípidos

¿Cómo impiden los hipertermófilos que sus membranas simplemente desaparezcan a tan altas temperaturas? Prácticamente todos ellos contienen lípidos construídos sobre la base del modelo de bifitanil tetraéter (*véase* Sección 4.5 para un estudio sobre la estructura de dichos lípidos). Éste es naturalmente resistente a la temperatura ya que, debido al enlace covalente entre las unidades de fitanilo, la membrana que genera es monocapa en lugar de bicapa lipídica como en las membranas normales (Sección 4.5 y Figura 4.20); esta esctuctura resiste la tendencia que tiene el calor para desorganizar la bicapa lipídica de ácidos grasos.

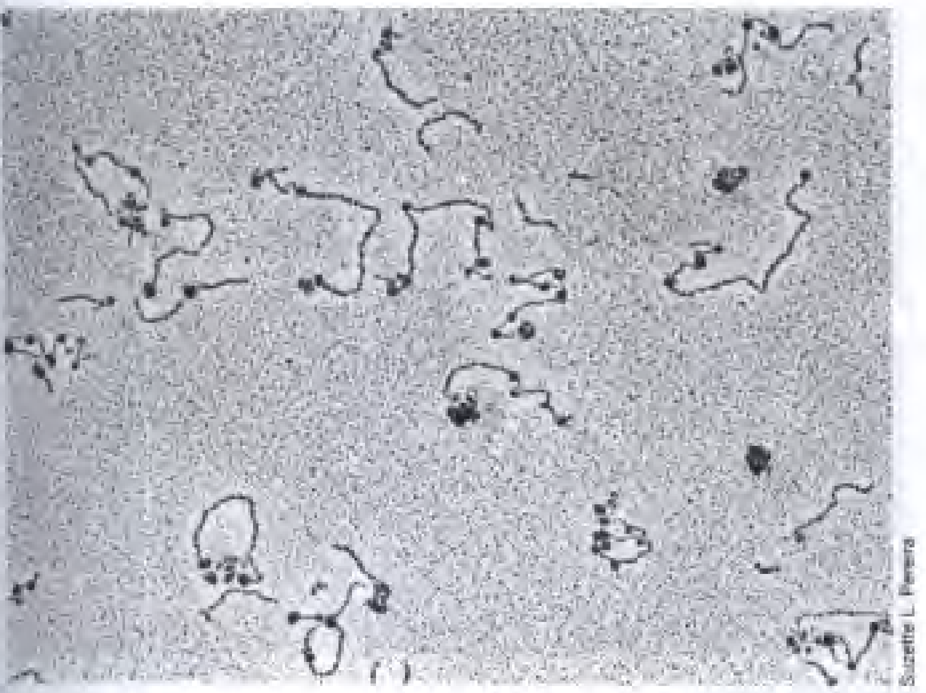

Suzette L. Pereira

Figura 13.23 Histonas de arqueas y nucleosomas. Micrografía electrónica de plásmidos linearizados rodeando a la histona Hmf (típica de *Methanothermus fervidus*, *véase* Figura 13.8c) para formar estructuras semejantes a los nucleosomas. Compare el lector esta imagen con la propuesta en la Figura 7.11 en la que se ven nucleosomas de *Eukarya*.

Estabilidad de los monómeros

Además de la estabilidad de las *macromoléculas*, la termolabilidad de los *monómeros* es importante para determinar cuáles son los límites superiores de temperatura que permiten el crecimiento de las bacterias hipetermófilas. No importa lo estables que sean las macromoléculas, la vida sería imposible, si los monómeros son inestables. De hecho la estabilidad térmica de las pequeñas moléculas, más que la de las grandes moléculas, puede dictar el límite superior de temperatura e incluso a temperaturas de 120°C, moléculas importantes se destruyen a una velocidad muy significativa. Por ejemplo, dos moléculas clave del metabolismo energético, ATP y NAD^+ se hidrolizan muy rápidamente a esta temperatura y su vida media es menos de 30 minutos a 120°C, disminuyendo dramáticamente a sólo segundos a temperaturas superiores. Con estas ideas «in mente» uno puede preguntarse ¿Cuál es el límite superior de temperatura para la vida?

Los límites para la existencia de vida microbiana

Como la vida tal como la conocemos es dependiente de agua líquida, los hábitats con temperaturas superiores a 100°C solamente se encuentran en ambientes *comprimidos*, tales como los fondos marinos. De hecho todos los *Archaea* hipertermofílicos capaces de crecer por encima de los 100°C están restringidos a estos ambientes supercalentados (*véase* Tabla 13.9). Pero, ¿cómo pueden existir estos ambientes y permitir la vida?

Una respuesta a esta pregunta se ha buscado a través del estudio de fuentes hidrotermales submarinas. Las fuentes hidrotermales y chimeneas negras emiten fluido a 250-350°C y originan estas estructuras metálicas denominadas *chimeneas* a partir de los sulfuros metálicos presentes en el fluido (Figura 19.19). Aunque los hipertermófilos se han aislado a partir de la pared de las chimeneas (que poseen un gradiente de temperatura desde los 250°C en interior hasta los 2°C en el exterior), los estudios del agua sobrecalentada a 250°C muestran que ésta es estéril; esto es consistente con los estudios de laboratorio que demuestran que las biomoléculas son rápidamente destruidas a estas temperaturas.

Los experimentos de laboratorio sugieren que la vida puede mantenerse a temperaturas de hasta 140-150°C, pero por encima de ellas los organismos no podrían hacerlo. Por ejemplo, si existiesen organismos capaces de crecer a 150°C, su economía energética tendría que estar basada en algo diferente al ATP-moneda universal de la energía- ya que el ATP es inestable a esta temperatura. Por ello si alguna vez se descubren «super» hipertermófilos capaces de crecer por encima de los 150°C, aportarán nuevos principios para la Bioquímica y la Biología.

13.12 *Archaea* hipertermófilos y evolución microbiana

Un aspecto interesante respecto a *Archaea* es la razón por la que con tanta frecuencia habitan en ambientes extremos. Aunque las sondas moleculares para ambientes no extremos (como suelo y agua) indica que los *Archaea* se encuentran también en ambientes no extremos (suelo y aguas), un aspecto recurrente entre los *Archea* cultivados es *su adaptación a los ambientes extremos*. Como se ha visto en este capítulo, se conocen diversas especies capaces de crecer por encima del punto de ebullición del agua, a valores extremos de pH o de concentración salina. ¿Es ésta una mera coincidencia o el reflejo de la historia evolutiva de la Tierra?

En la Tierra primigenia existieron ambientes extremos como ocurre en la actualidad, y fue en esos ambientes en los que pudo aparecer la vida. En el tiempo en que evolucionó por vez primera la vida en la Tierra, ésta era seguramente mucho más caliente que en la actualidad (*véase* Sección 11.1), por ello, los hipertermófilos, en particular, pueden considerarse como los mejores candidatos a ser los representantes de las primeras formas de vida en la Tierra. ¿Qué nos indica el árbol filogenético de *Archaea* sobre estos hipertermófilos?

Los hipertermófilos y sus lentos relojes evolutivos

El estudio de la secuencia de diversos genomas de *Archaea* permite inferir que evolucionan más lentamente que *Bacteria* y *Eukarya*. Esto es particularmente cierto en el caso de los *Archaea* hipertermofílicos euryarchaeotas y crenarchaeotas (*véase* Figura 13.1). Cosa parecida puede decirse de *Bacteria* hipertermofílicas como son *Thermotoga* y *Aquifex* (Figura 12.1). Esta conclusión se extrae de estudiar el árbol evolutivo; los linajes de los hipertermófilos son muy cortos y se ramifican cerca de la base (*véanse* Figura 12.1 y Figura 13.1).

No se sabe por qué las *Archaea* adictas al calor poseen relojes evolutivos tan lentos, pero una hipótesis maneja la idea de que es el resultado precisamente de vivir en ambientes tan extremos. En otras palabras, el margen evolutivo en estos ambientes es muy estrecho y están sometidos a tremenda presión para mantener activos un puñado de genes que son en realidad los responsables de la termorresistencia celular. Esto es, más allá de un punto, en la supervivencia de los hipertermófilos deja de tener sentido el concepto de cambio génico y selección, que tan bien aplica en sus primos mesófilos. Si esta hipótesis es la correcta, entonces las *Archaea* son reliquias vivientes de las formas primigenias de vida y su estudio racional, concienzudo y serio debe llevarnos a comprender principios importantes sobre el inicio de la vida en la Tierra.

«Korarchaeota»

Esta interesante idea de relojes evolutivos lentos puede explorarse también en el phylum «Korarchaeota» que se muestra en el árbol evolutivo de la Figura 13.1 y que es el que menos deriva posee. Desgraciadamente todavía conocemos poco sobre ellos. Solamente se han identificado en un único manantial «Estanque obsidiana» del parque nacional de Yellowstone de Wyoming y todavía el grupo no está reconocido oficialmente. Sin embargo, existen cultivos mixtos de laboratorio de estos microorganismos (Figura 13.24) que indican claramente que son hipertermófilos, como era de esperar en procariotas cercanos a la base del árbol *Archaea*. Se anticipan más progresos en este grupo tan interesante y su estudio puede revelar secretos sobre la Tierra primigenia y sus formas de vida iniciales.

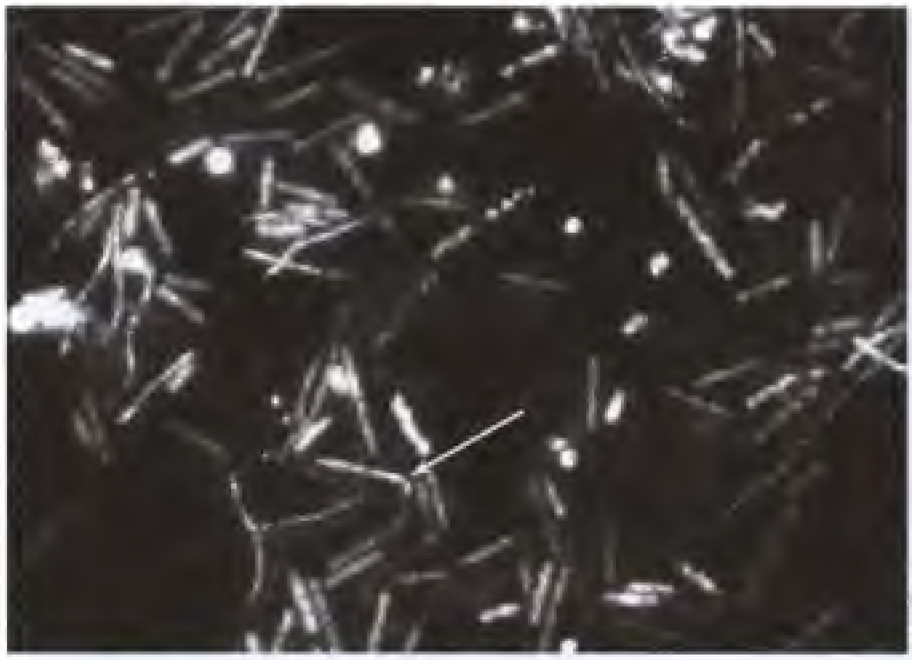

Nicole Eis

Figura 13.24 «Korarchaeota». Observación de contraste de fases de un cultivo de enriquecimiento que contiene estas bacterias. Se observan varias *Archaea* en esta fase del enriquecimiento constituyendo estas reliquias evolutivas menos del 1% de la población. Las células de un korarchaeota son bacilares ligeramente curvados de 5-10 µm de largo.

El hidrógeno como forma de energía primitiva

Antes de dejar este Capítulo nos gustaría hacer resaltar con qué frecuencia el *hidrógeno* se encuentra implicado en el marco *metabólico* de este grupo de bacterias; muchas *Archaea* crecen anaeróbicamente con hidrógeno como donador de electrones y uno o más aceptores de electrones, S^0, NO_3^- y Fe^{3+} (*véase* Tabla 13.8). Casi con toda seguridad el metabolismo del hidrógeno es una reliquia fisiológica de esquemas bioquímicos antiguos (la Figura 11.5 da un claro ejemplo), ya que estos elementos inorgánicos eran muy abundantes entonces. La diversidad de *Archaea* hipertermófilas oxidantes de hidrógeno en la actualidad, (y *Bacteria*, *véanse* Secciones 12.4 y 12.37) y el hecho de que muchas *Bacteria* mesófilas (parientes distantes de los oxidadores de H_2, *véase* Figura 12.1) también utilizan H_2; señalar que la evolución de la oxidación del H_2 fue un éxito en la evolución del metabolismo. De hecho, la habilidad para usar el hidrógeno por parte de hipertermófilos y de aquellos procariotas que viven en las profundidades de la Tierra, ofrece ejemplos viables de esta estrategia metabólica (*véase* Sección 19.4). Las fuentes hidrotermales submarinas, hábitat hoy de los hipertermófilos más extremos, han sido propuestos como ambientes propicios semejantes a los primigenios donde pudo haber surgido la vida en este planeta. Estos ambientes contienen abundantes donadores y aceptores de electrones y están libres de las dañinas radicaciones ultravioleta. Por todo lo expuesto en el capítulo es bastante posible que los hipertermófilos actuales sean en reliquias vivientes de los primeros habitantes de la Tierra.

✓ 13.11-13.12 Revisión de conceptos

Aunque los hipertermófilos viven en ambientes de altas temperaturas, en algunos casos superiores a la temperatura de ebullición del agua, existen límites más allá de los cuales la vida simplemente no puede existir. Este límite es probablemente inferior a 140-150°C.

- ✓ ¿Cómo consiguen los hipertermófilos que macromoléculas importantes como las proteínas y el DNA no se destruyan por el calor?
- ✓ Indique al menos dos razones de por qué existe, sin ninguna duda, un límite superior de temperatura para la vida.
- ✓ ¿Qué hecho sugiere que los hipertermófilos actuales se asemejan a los organismos primigenios?
- ✓ ¿Qué forma de metabolismo energético era seguramente la clave en los antiguos organismos?

Preguntas de repaso

1. ¿Cuáles son las características que tienen en común todos los *Archaea*?
2. ¿Cuál de estos organismos, *Pyrodictium*, *Thermoplasma* o *Methanosarcina* es el pariente más próximo del halófilo *Halobacterium*? (Pista: la respuesta está en la Figura 13.1)
3. ¿Cómo pueden organismos como *Halobacterium* sobrevivir en ambientes hipersalinos y organismos como *E. coli* no puede?
4. Compare los papeles de la bacteriorrodopsina, halorrodopsina y la rodopsina sensora en *Halobacterium salinarium*.
5. ¿Cuál es el donador de electrones para la metanogénesis cuando el CO_2 es reducido a CH_4?
6. ¿Cuál es la principal característica que unifica a todos los Thermoplasmatales? ¿Por qué esto permite a algunos de ellos colonizar con éxito las minas a elevadas temperaturas?
7. ¿Cuál es la característica fisiológica única de *Methanopyrus* comparado con otro metanógeno como *Methanobacterium*?
8. ¿Cuál es la característica más sobresaliente de *Pyrolobus fumari*?
9. ¿Qué es la *girasa reversa* y por qué es tan importante para los hipertermófilos?

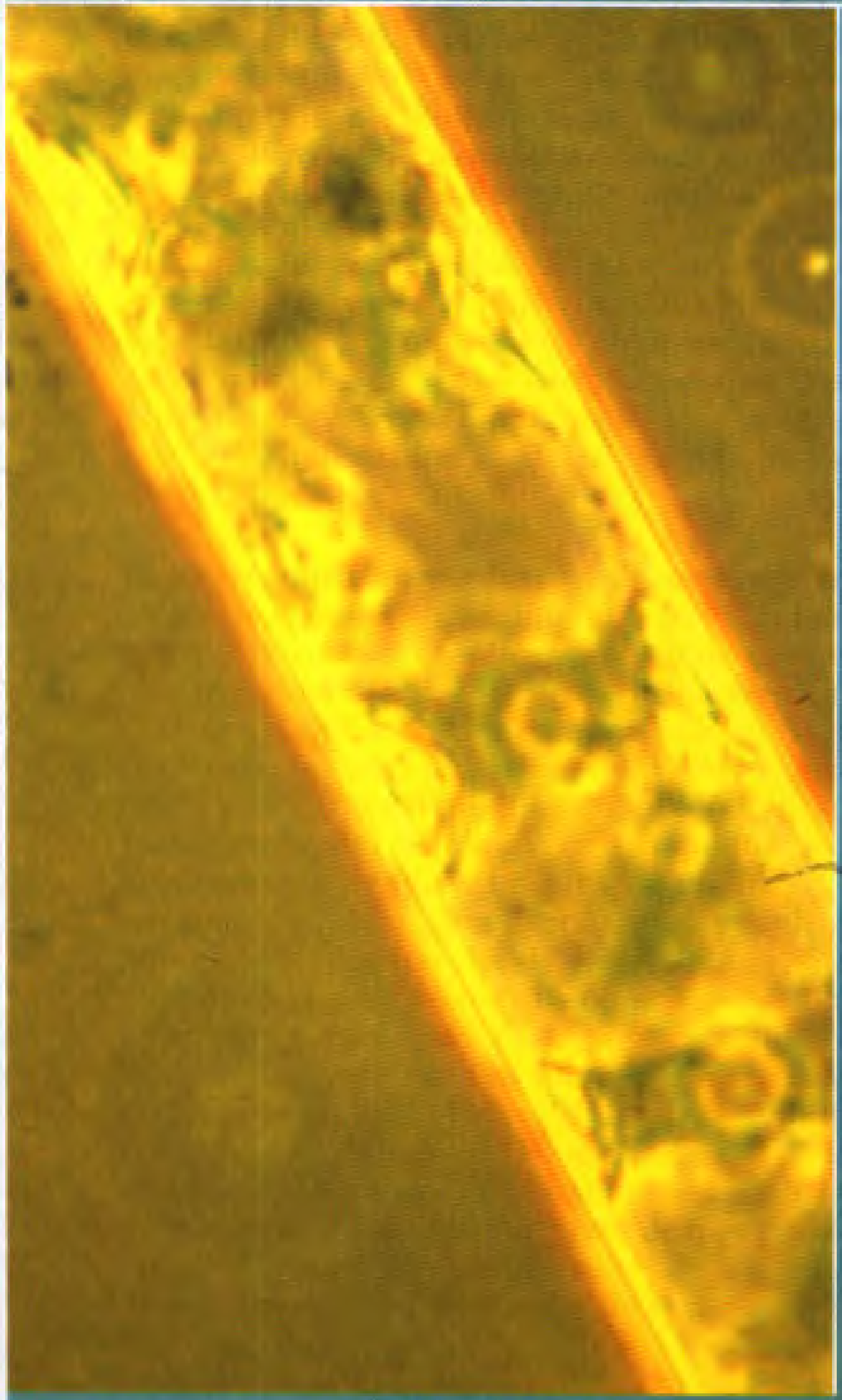
Ejercicios prácticos

1. Utilizando los datos de la Figura 13.1 como guía, discuta por qué la bacteriorrodopsina fue probablemente una invención evolutiva tardía.
2. Defienda o refute la siguiente afirmación: «El límite superior de temperatura no está relacionado con la estabilidad de macromoléculas tales como proteínas o ácidos nucleicos.

Las células eucarióticas incluyen tanto formas microbianas como plantas y animales. El alga verde *Spirogyra* que se muestra aquí contiene los orgánulos típicos de una célula eucariótica fototrópica, como el núcleo y cloroplastos. Otros eucariotas microbianos son los protozoos, hongos y hongos mucosos. Todos estos organismos son quimeras genéticas porque contienen genes de dos fuentes. Éstos incluyen genes nucleares, por supuesto, pero también genes que residen en el cloroplasto y en la mitocondria. Estos últimos son el remanente de genomas de *Bacteria* de vida libre que, hace eones, establecieron relaciones estables con microorganismos eucarióticos en el proceso de la *endosimbiosis*.

14

BIOLOGÍA DE LA CÉLULA EUCARIÓTICA Y MICROORGANISMOS EUCARIÓTICOS



I LA CÉLULA EUCARIÓTICA/ESTRUCTURA FUNCIÓN Y GENÉTICA 469
14.1 Estructura de la célula eucariótica y el núcleo 469
14.2 Orgánulos respiratorios: la mitocondria y el hidrogenosoma 470
14.3 Orgánulo fotosintético: el cloroplasto 472
14.4 Relaciones de las mitocondrias y los cloroplastos con *Bacteria* 473
14.5 Otros orgánulos y estructuras celulares eucarióticas 474
14.6 Generalidades de la genética de eucariotas 475

II DIVERSIDAD MICROBIANA EN EUCARIOTAS 477
14.7 Generalidades filogenéticas de *Eukarya* 477
14.8 Protozoos 478
14.9 Hongos 482
14.10 Hongos mucosos 485
14.11 Algas 487

Glosario

Algas microorganismos eucarióticos fototrópicos

Ciliados un grupo de protozoos que se caracterizan por su rápido movimiento producido por los cilios: apéndices cortos y numerosos

Citoesqueleto entramado de microfibrillas típico de las células eucarióticas que determina la forma celular

Cloroplasto el orgánulo fotosintético de eucariotas fototrópicos

Conidios esporas asexuales de los hongos

Endosimbiosis teoría para explica el origen de los orgánulos eucarióticos. Según ella, éstos surgieron de bacterias englobadas por otras en su citoplasma

Esporozoos protozoos parásitos inmóviles

Fagocitosis proceso por el cual una partícula es englobada por la membrana citoplasmática e internalizada

Flagelados un grupo de protozoos caracterizados por su movilidad, producida por un apéndice largo que se mueve como un látigo

Hidrogenosoma un orgánulo de origen endosimbiótico presente en ciertos microorganismos eucarióticos anaeróbicos que funcionan oxidando el piruvato a hidrógeno, dióxido de carbono y acetato con producción de un ATP

Hongos microorganismos eucarióticos no fototrópicos con paredes celulares rígidas

Hongos mucosos microorganismos eucarióticos no fototróficos que carecen de pared celular y se agregan para formar cuerpos fructíferos o masas de protoplasma

Levaduras hongos unicelulares

Meiosis proceso de división nuclear durante la gametogénesis en el que la repetición cromosómica pasa de dos (diploide) a una sola copia de cada cromosoma (haploide)

Mitocrondria orgánulo respiratorio de los organismos eucarióticos

Mitosis proceso de replicación y partición de los cromosomas en las células eucarióticas que van a las células hijas

Mohos hongos filamentosos

Movimiento ameboide un tipo de movilidad, en que el movimiento del citoplasma impulsa al organismo hacia adelante

Protozoos microorganismos unicelulares eucarióticos no fototróficos que carecen de pared celular

Quitina un polímero de N-acetil-D-glucosamina que se encuentra habitualmente en las paredes celulares de hongos y algas

Setas hongos filamentosos que producen cuerpos fructíferos macroscópicos, frecuentemente comestibles

Tilacoides capas de membranas que contienen los pigmentos fotosintéticos en los cloroplastos

---

En este capítulo se considerarán la estructura, filogenia y diversidad de los microorganismos eucarióticos. Brevemente hemos visto algo sobre ellos en los Capítulos 2 y 7, y descrito algunas características como es la presencia de intrones en sus genes y la compleja maquinaria transcripcional. Aquí veremos que algunos eucariotas se asemejan a los procariotas en su estructura interna, mientras que otros son mucho más complejos. También desarrollaremos la biología básica de los eucariotas que servirá más adelante para entender las relaciones parásito-hospedador, inmunología y enfermedad (*véanse* Unidades IV y V), aspectos que requieren las actividades de las células eucarióticas.

I LA CÉLULA EUCARIÓTICA/ESTRUCTURA FUNCIÓN Y GENÉTICA

Las seis siguientes secciones exploran la estructura de la célula eucariótica, la relación ancestral entre los orgánulos eucarióticos y *Bacteria*, así como la genética básica de eucariotas, utilizando las levaduras como modelo.

14.1 Estructura de la célula eucariótica y el núcleo

Una célula eucariótica es estructuralmente más compleja que una procariótica (Figura 14.1). El DNA en un procariota no está contenido en un núcleo (para una excepción *véase* Sección 12.29) mientras que los eucariotas contienen un *núcleo rodeado por una membrana*. La mayoría de los eucariotas tienen otras estructuras intracelulares y estructurales dependiendo del organismo. Así, por ejemplo, las mitocondrias son orgánulos casi universales entre las células eucarióticas, mientras que los cloroplastos son orgánulos presentes solamente en las células fototróficas. Las células eucarióticas pueden poseer pared celular (hongos, algas y plantas superiores) o carecer de ella (protozoos y células animales). Otras estructuras internas, tales como el aparato de Golgi, microsomas, retículo endoplasmático y microtúbulos son también típicas de las células eucarióticas (Figura 14.1) y sus funciones se describirán en breve.

Núcleo

El núcleo contiene el genoma de la célula (Figura 14.2). En los eucariotas, el DNA está formando cromosomas (el complejo empaquetamiento del DNA necesario para formar estas estructuras se describió en el Capítulo 7). En muchas células eucarióticas, el núcleo mide varios micrómetros de diámetro, fácilmente visible con el microscopio óptico sin necesidad de tinción (*véase* Figura 4.7*a*). En los eucariotas

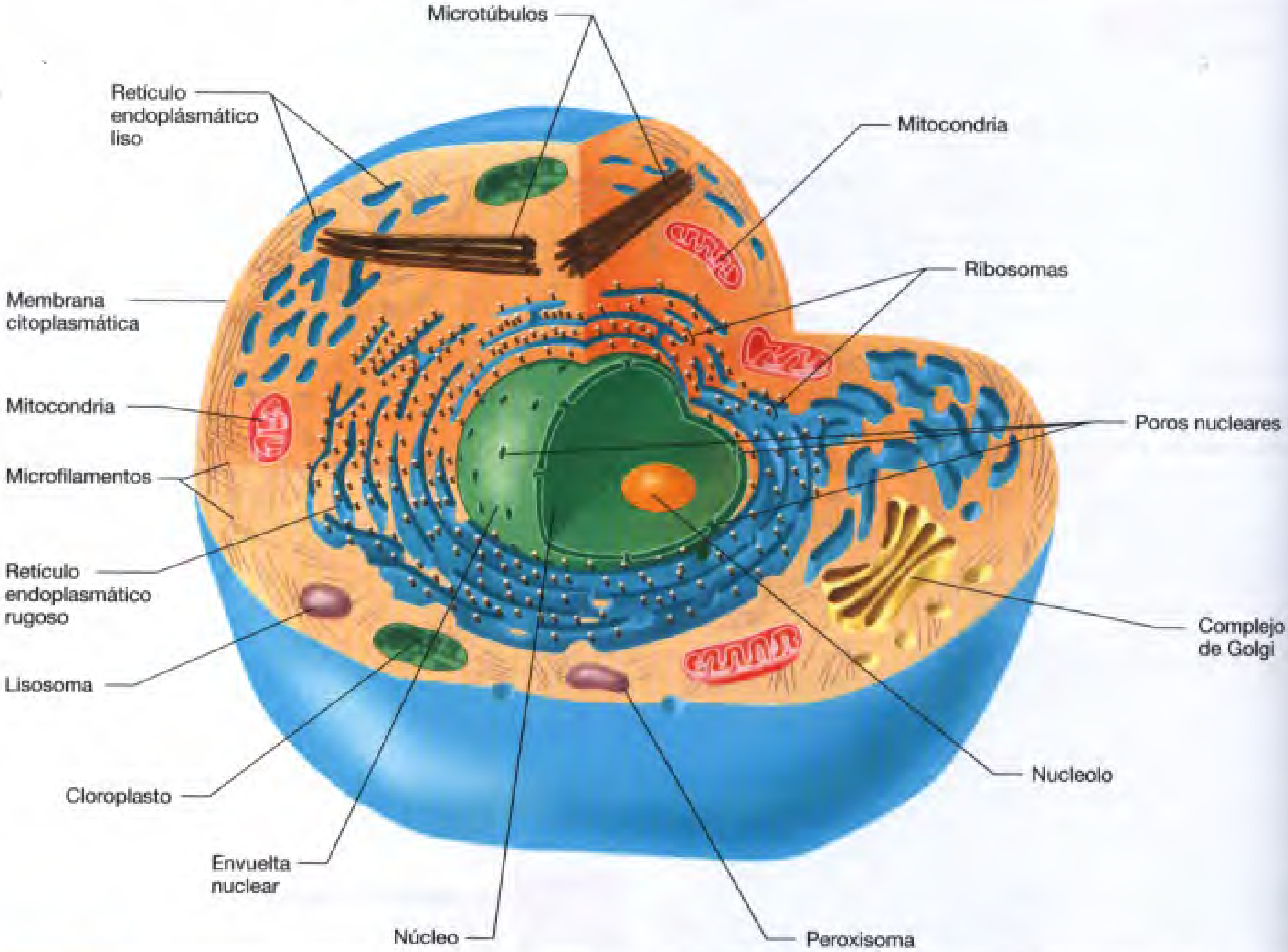

Microtúbulos
Retículo endoplásmático liso
Mitocondria
Membrana citoplasmática
Ribosomas
Mitocondria
Poros nucleares
Microfilamentos
Retículo endoplasmático rugoso
Complejo de Golgi
Lisosoma
Cloroplasto
Nucleolo
Envuelta nuclear
Núcleo
Peroxisoma

Figura 14.1 Visión esquemática tridimensional de una célula eucariótica. Aunque todas las células eucarióticas contienen un núcleo, no todos los orgánulos y otras estructuras mostradas están presentes en todas las células eucarióticas.

más pequeños, sin embargo, es necesario proceder a una tinción para poder observarlo.

La membrana nuclear consiste en *dos* unidades de membrana que dejan un espacio de grosor variable. La membrana interna es un simple saco, pero la externa suele tener continuidad en el retículo endoplasmático. De esta manera existe una especialización de la membrana nuclear: la interna se especializa en sus relaciones con el nucleoplasma y la externa con el citoplasma y el retículo endoplasmático.

La membrana nuclear contiene poros (Figura 14.2) que son lugares en los que las dos membranas se unen. El poro está formado por diversas proteínas con función de importar y exportar sustancias al interior y al exterior del núcleo. Dado que se trata de un transporte a través de la membrana (*véase* Sección 4.7), el proceso requiere energía que procede de la hidrólisis del guanosín-trifosfato (GTP).

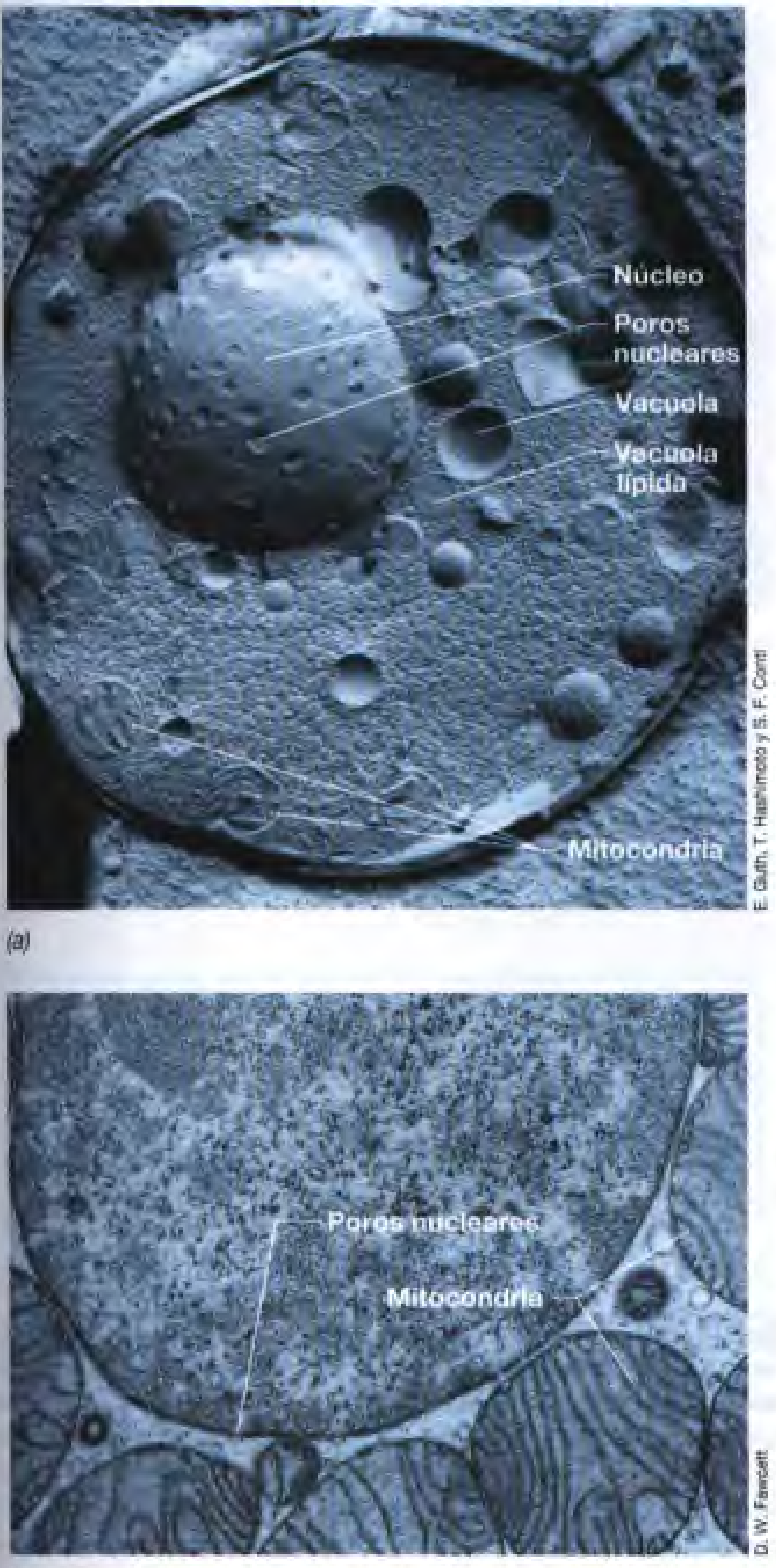
Una estructura que se ve frecuentemente dentro del núcleo es el *nucleolo,* una zona muy rica en RNA que es el lugar donde se sintetiza el rRNA. Las proteínas ribosómicas se sintetizan en el citoplasma y son transportadas al nucleolo para ensamblarse con sus rRNA, dando lugar allí a las dos subunidades ribosómicas (60S + 40S), que son exportadas al citoplasma donde se asociarán para dar lugar al ribosoma completo, para participar en procesos de traducción.

14.2 Orgánulos respiratorios: la mitocondria y el hidrogenosoma

La mitocondria y el hidrogenosoma son orgánulos que se han especializado en el metabolismo energético quimiotrófico. Aquí nos centramos en estos orgánulos de la respiración y se considerarán los cloroplastos en la sección siguiente.

Mitocondrias

En células eucarióticas aeróbicas, los procesos de respiración y de fosforilación oxidativa (un mecanismo de for-



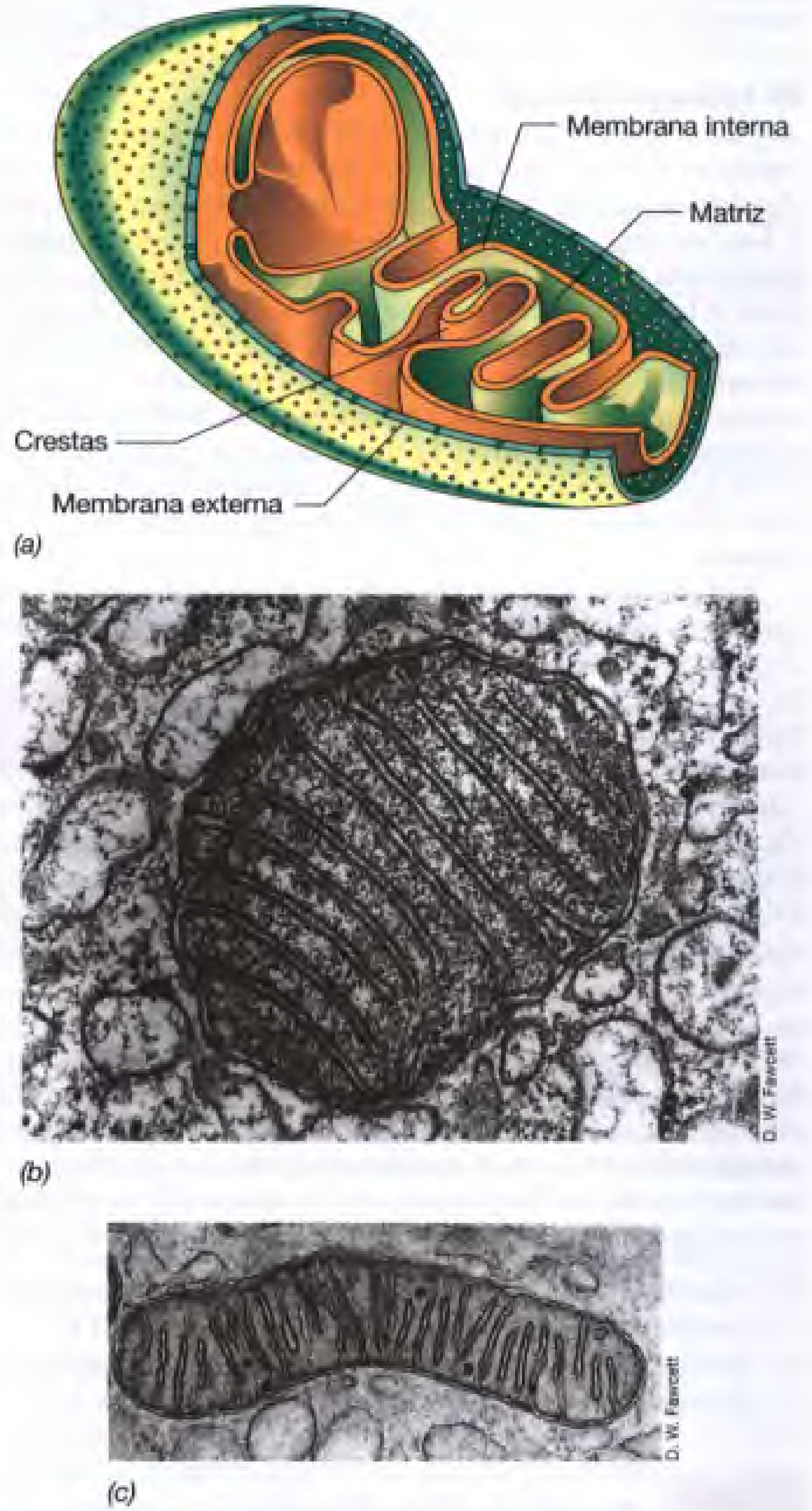
E. Guth, T. Hashimoto y S. F. Conti

D. W. Fawcett

Figura 14.2 El núcleo y los poros nucleares. (a) Micrografía electrónica de una célula de levadura por el método de criofractura mostrando la superficie del núcleo. La célula es aproximadamente de 8 μm de ancho. (b) Corte fino de un adipocito de ratón mostrando una porción del núcleo y diversas mitocondrias. El núcleo es aproximadamente de unos 2 μm de ancho. Nótese la presencia de poros tanto en (a) como en (b).

mación de ATP) (*véanse* Secciones 5.11 y 5.12) están localizados en orgánulos con membrana denominados **mitocondrias**. Las mitocondrias tienen un tamaño semejante al de células procarióticas y su forma puede ser abastonada o casi esférica (*véase* Figura 14.3). Una célula animal típica, contiene alrededor de 1000 mitocrondrias, pero el número por célula depende del tipo y tamaño de célula; una célula de levadura puede tener muchas menos mitocondrias por célula. La membrana mitocondrial, que carece de esteroles, es menos rígida que la citoplasmática que sí posee esteroles. Por tanto, las mitocondrias poseen una plasticidad considerable, que hace que posean una morfología muy variable (Figura 14.3*b*, *c*).

La membrana mitocondrial está construida de una manera normal, es decir, de una bicapa de fosfolípidos con



D. W. Fawcett

D. W. Fawcett

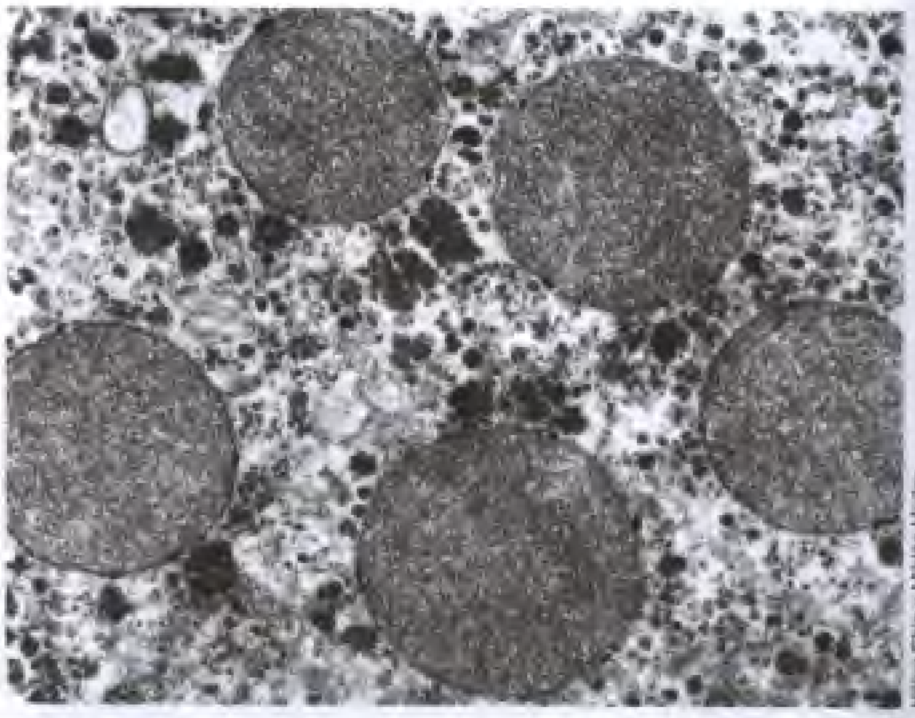
Figura 14.3 Estructura de una mitocondria. (a) Diagrama mostrando la estructura global de una mitocondria. Nótese la membrana interna y la externa. (b,c) Micrografías de transmisión de mitocondrias de músculo de rata, mostrando la variabilidad en la morfología de una mitocondria típica.

proteínas embebidas en ella (*véase* Sección 4.5); es bastante permeable y posee canales diminutos que dejan pasar iones y pequeñas moléculas. A través de ellos sale al citoplasma el ATP que genera el orgánulo y que será utilizado en todas las reacciones bioquímicas celulares que lo requieran. La membrana interna origina una serie de plegamientos o *crestas* que es donde se produce la síntesis del ATP. Las crestas también contienen proteínas específicas que regulan el paso de metabolitos dentro y fuera de la matriz mitocondrial (Figura 14.3*a*). Esta matriz contiene bastantes enzimas implicadas en la respiración de compuestos orgánicos y, en particular, las enzimas del ciclo del ácido cítrico (*véase* Sección 5.13).

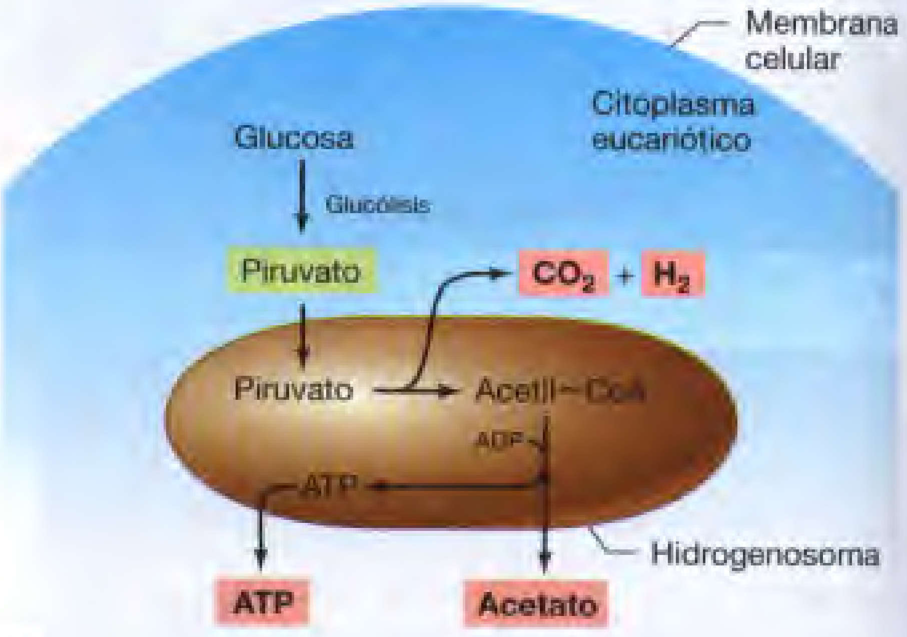
El hidrogenosoma

Algunos microorganismos eucarióticos carecen de mitocondrias y en su lugar poseen un orgánulo respiratorio rodeado por unidad de membrana, distinto estructuralmente y funcionalmente de la mitocondria, que llamamos **hidrogenosoma** (Figura 14.4*a*). Aunque es de un tamaño semejante a la mitocondria, carece de crestas y de las enzimas del ciclo del ácido cítrico (Figura 14.3). Existen bastantes eucariotas que poseen este orgánulo y todos ellos son anaerobios estrictos o aerotolerantes pero con metabolismo estrictamente fermentativo. Entre otros, se incluyen parásitos como los flagelados *Tricomonas* y protozoos ciliados del rumen animal (*véase* Sección 19.11) y lodos anóxicos y sedimentos.

Las reacciones bioquímicas de un hidrogenosoma se centran en la oxidación del piruvato para dar H_2CO_2 y acetato (Figura 14.4*b*). El piruvato es oxidado a acetil-coA junto con H_2 más CO_2 (Figura 14.4*b*). En algunos eucariotas anaeróbicos, se ha visto que en su citoplasma residen procariotas simbiontes (Figura 19.26*b*, *c*) generadores de metano que consumen el hidrógeno y el anhídrido carbónico. Como el hidrogenosoma carece de ciclo del ácido cítrico y de cadena transportadora de electrones, no pueden oxidar el acetato originado de la oxidación del piruvato y es exportado hasta el citoplasma celular de la célula hospedadora (Figura 14.4*b*).


Helen Shio y Miklós Müller

(*a*)



(*b*)

Figura 14.4 El hidrogenosoma. (a) Micrografía del flagelado anaerobio *Trichomonas vaginalis* mostrando 5 hidrogenosomas. (b) Bioquímica del hidrogenosoma. El piruvato es tomado por el hidrogenosoma a la vez que se produce H_2, CO_2, acetato y ATP. Las enzimas clave del hidrogenosoma son piruvato: ferredoxin oxidorreductasa e hidrogenasa. A menudo, en el citoplasma de eucariotas que portan hidrogenosomas, se detectan endosimbiontes metanogénicos que originan metano a partir del hidrógeno y anhidrido carbónico (Figura 19.26c).

✓ 14.2 Revisión de conceptos

La mitocondria y el hidrogenosoma son orgánulos de respiración de células eucarióticas. Las mitocondrias han evolucionado especializándose en la respiración aeróbica, mientras que el hidrogenosoma de ciertos eucariotas anaerobios fermenta el piruvato hasta hidrógeno más anhídrido carbónico, acetato y ATP.

- ✓ ¿Qué sustancias y por qué deja pasar la membrana mitocondrial?
- ✓ Compare y contraste el destino metabólico del piruvato en las mitocondrias y en el hidrogenosoma.

14.3 Orgánulo fotosintético: el cloroplasto

Los cloroplastos son orgánulos que contienen clorofila y que se encuentran en eucariotas capaces de llevar a cabo la fotosíntesis (algas y plantas). Los cloroplastos de muchas plantas son relativamente grandes y visibles al microscopio (Figura 14.5). El tamaño, la forma y el número de cloroplastos por célula varía mucho y, al contrario que las mitocondrias, son mucho más grandes que las bacterias.

Como las mitocondrias poseen una membrana externa permeable y otra interna, mucho menos permeable, que dejan entre sí un espacio intermembranal. La interna rodea el lumen del cloroplasto llamado *estroma* pero no forma crestas como en el caso de las mitocondrias. En su lugar, la clorofila y el resto de los componentes necesarios para la fotosíntesis se localizan en una serie de discos aplanados llamados **tilacoides** (Figura 14.6). Las membranas de los ti-

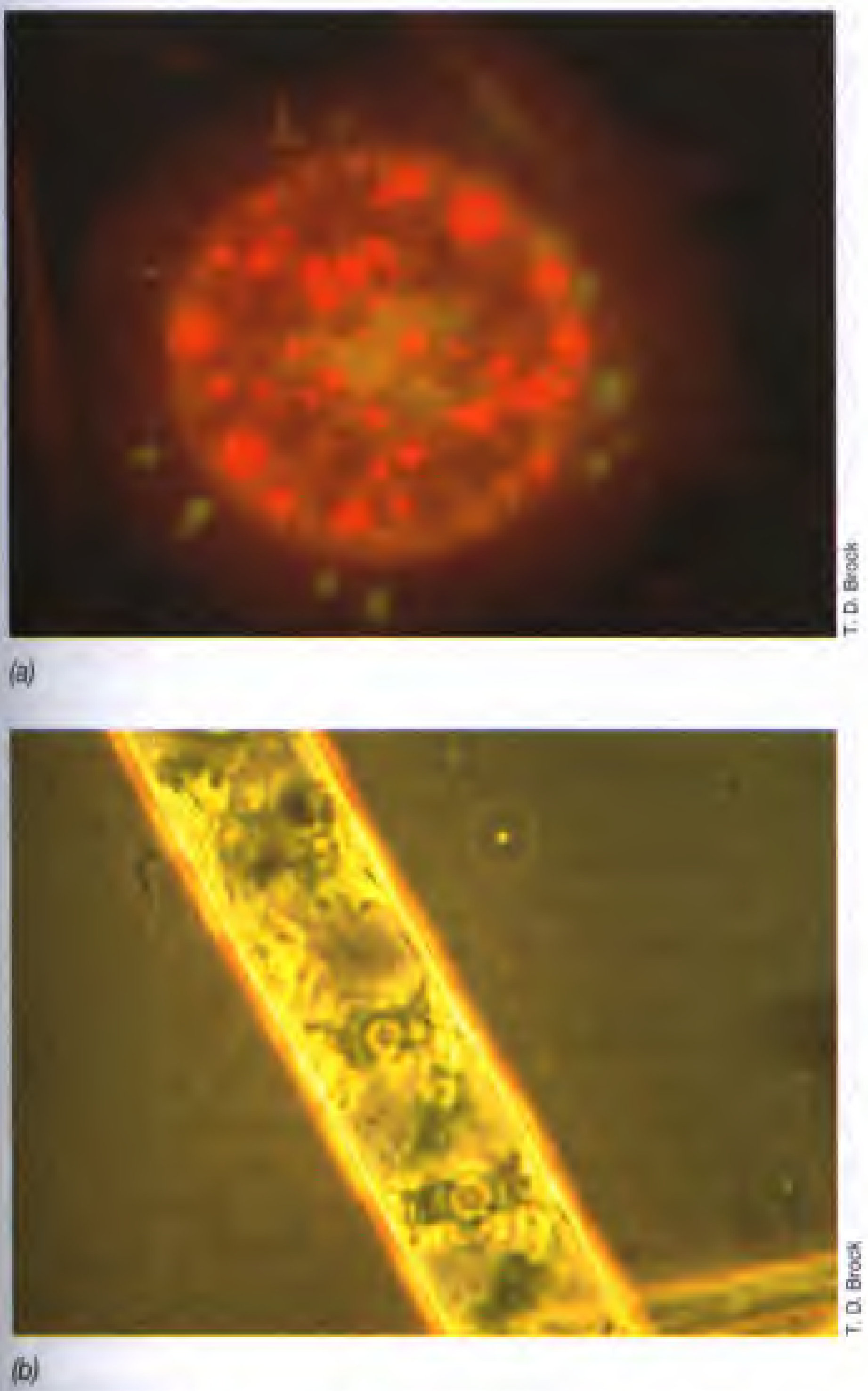
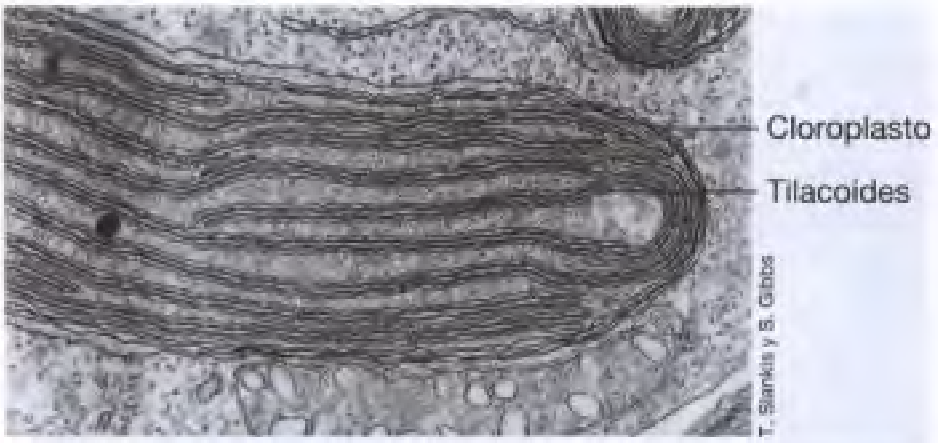


Figura 14.5 Micrografías de algas mostrando los cloroplastos. (a) Micrografía fluorescente de la diatomea *Stephanodiscus*. La clorofila del cloroplasto absorbe luz y da fluorescencia roja. (b) Micrografía de contraste de fases de *Spirogyra* mostrando la forma característica en espiral del cloroplasto.



T. Slankis y S. Gibbs

Figura 14.6 Fotografía al microscopio electrónico de transmisión mostrando un cloroplasto del alga *Ochromonas clanica*. Nótense los tilacoides.

lacoides son altamente impermeables a los iones y otros metabolitos, ya que su función es establecer la fuerza motriz de protones necesaria para la síntesis de ATP (*véase* Sección 5.12). En algas verdes, así como en plantas, los tilacoides se organizan en pilas que se llaman *grana* (*véase* Figura 17.5).

El estroma del cloroplasto contiene grandes cantidades de la enzima *ribulosa bifosfato carboxilasa-Rubis*CO-. Ésta es la enzima clave del ciclo de Calvin por la cual la mayoría de los organismos fotosintéticos convierte el CO_2 a carbono orgánico (*véase* Sección 17.6). RubisCO constituye hasta el 50% de la proteína total del cloroplasto y cataliza la formación de ácido fosfoglicérico, un compuesto clave en la biosíntesis de glucosa (*véanse* Secciones 5.10 y 5.12). La permeabilidad de la membrana más externa permite a la glucosa y al ATP producidos durante la fotosíntesis difundir hasta el citoplasma, donde serán utilizados en las rutas bioquímicas habituales para la síntesis de nuevo material celular.

✓ 14.3 Revisión de conceptos

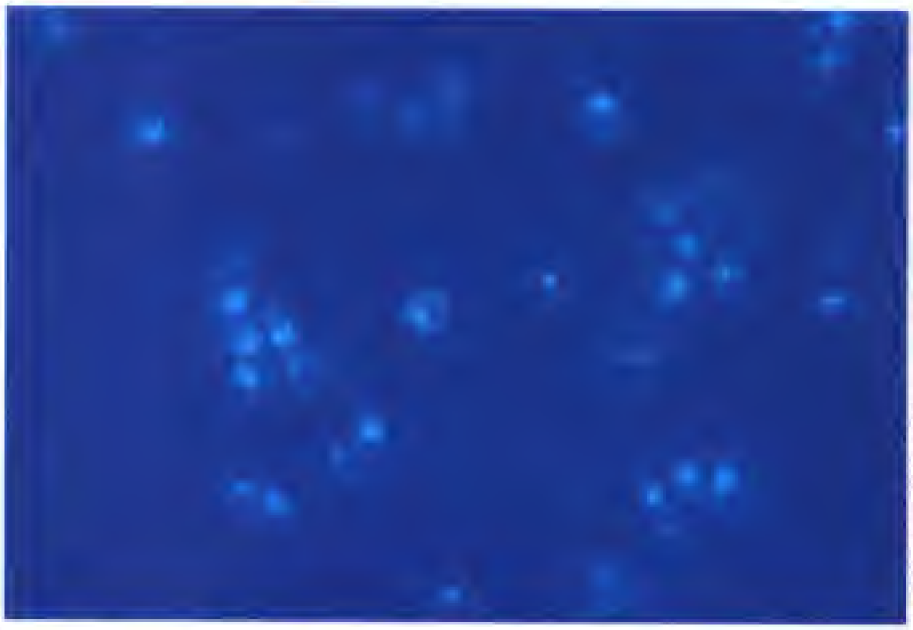
Los cloroplastos son los lugares de producción de energía fotosintética y fijación de CO_2 en los eucariotas fototrópicos.

- ✓ Diferencie el estroma de los tilacoides.
- ✓ ¿Cuál es la función de RubisCO y dónde se encuentra?

14.4 Relaciones de las mitocondrias y cloroplastos con *Bacteria*

En función de su autonomía relativa y semejanza a las bacterias, se sugirió hace tiempo que las mitocondrias y cloroplastos eran descendientes de organismos procarióticos antiguos. Esta teoría de la *endosimbiosis* propone que los eucariotas surgieron del englobamiento de una célula *procariótica* por otra más grande (el hospedador) (*véase* Sección 11.3). Esta teoría predice que la célula *eucariótica* es una quimera genética que contiene DNA de dos fuentes: el endosimbionte y la célula hospedadora. Diversas líneas de pruebas moleculares han confirmado esta predicción y la teoría de la endosimbiosis en general; éstas las resumimos aquí:

1. ***Las mitocondrias y cloroplastos contienen DNA***. Aunque la mayoría de sus funciones están codificadas por el DNA nuclear, algunos componentes de los orgánulos están codificados por su propio genoma. Éstos son el RNA ribosómico, RNAs de transferencia y ciertas proteínas de la cadena respiratoria. Además, el DNA de las mitocondrias y los cloroplastos adopta una forma *circular* covalentemente unida, como en los procariotas (*véanse* Secciones 2.2, 7.2 y 7.3). El DNA mitocondrial puede ser observado utilizando métodos especiales de tinción (Figura 14.7)
2. ***El núcleo eucariótico contiene genes que derivan de bacterias.*** La secuenciación del genoma (*véase* Capí-



Jian-Ming Li y Nancy Martin

Figura 14.7 Células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* teñidas con 4'6-diamidina-2'-fenilindol dihidrocloruro DAPI (*véase* Sección 18.3) para mostrar el DNA mitocondrial. Cada mitocondria tiene de dos a cuatro círculos de DNA que se tiñen de azul por este método.

tulo 15) y otros estudios genéticos han demostrado claramente que diversos genes nucleares dirigen las actividades de los orgánulos. Ya que la secuencia de estos genes se asemeja a sus equivalentes bacterianos, muchos científicos creen que estos genes fueron transferidos desde el endosimbionte hasta el núcleo durante la evolución del orgánulo actual.

3. ***Las mitocondrias y cloroplastos contienen sus propios ribosomas.*** Los ribosomas, estructuras celulares implicadas en la síntesis de proteínas (*véase* Sección 7.15), existen bien como Unidades 80 Svedberg (S), típicos del citoplasma de células eucarióticas, o como formas más pequeñas de 70S, característicos de los procariotas. Las mitocondrias y cloroplastos contienen ribosomas que son 70S como los de los procariotas.
4. ***Especificidad antibiótica.*** Diversos antibióticos (estreptomicina, por ejemplo) matan o inhiben *Bacteria* al interferir específicamente con la función del ribosoma 70S; estos mismos antibióticos también inhiben la síntesis de proteínas en las mitocondrias y cloroplastos.
5. ***Filogenia molecular.*** Los estudios filogenéticos utilizando los métodos de secuencia comparativos de RNA ribosómico (*véase* Sección 11.4-11.8) han demostrado que las mitocondrias y cloroplastos están relacionados con las bacterias. Estos estudios indican claramente que las células eucarióticas modernas se han originado de una asociación de dos organismos, presumiblemente por endosimbiosis (*véanse* Sección 11.3 y Figura 11.7).

También se han encontrado evidencias de que los hidrogenosomas son de igual manera endosimbiontes. Por ejemplo, en el protozoo ciliado anaeróbico *Nyctotherus ovalis*, que vive en el tracto intestinal posterior de las termitas (*véase* Sección 9.10), se han identificado hidrogenomonas que contienen ribosomas y DNA. Además, el núcleo de este eucariota contiene genes que codifican proteínas específicas conocidas por tener un origen bacteriano. Por ello, el hidrogenomona probablemente se originó por endosimbiosis de una bacteria fermentadora de piruvato (tal como las especies del actual género *Clostridium*) con un eucariota microbiano anaeróbico, presumiblemente como una forma de extraer un poco más de energía de un metabolismo estrictamente afermentativo (Figura 14.4*b*). Si esto es cierto, la mitocondria y el hidrogenosoma pueden considerarse orgánulos relacionados que simplemente muestran diferentes modelos metabólicos.

En resumen, muchos tipos de pruebas indican que los orgánulos celulares se originaron por endosimbiosis de bacterias de vida libre en una célula eucariótica. Así, la célula hospedadora obtiene estructuras especializadas en la generación de energía, mientras que los simbiontes obtienen estabilidad y un ambiente adecuado. Que la endosimbiosis fue un éxito evolutivo lo demuestra el hecho de que, con raras excepciones, los orgánulos productores de energía, como mitocondrias y cloroplastos, están presentes en las células eucarióticas actuales.

✓ 14.4 Revisión de conceptos

Los cloroplastos son orgánulos metabólicos clave de los eucariotas en la fotosíntesis, y las mitocondrias o hidrogenosomas en la respiración y fermentación. Es plausible que estos orgánulos se originaron de *Bacteria* y establecieron residencia permanente dentro de otras células (endosimbiosis).

- ✓ Resuma la prueba molecular que apoya la relación de los orgánulos con *Bacteria*.
- ✓ ¿Por qué podría un organismo como *Nyctotherus* ser más eficaz con un hidrogenosoma que con una mitocondria?

14.5 Otros orgánulos y estructuras celulares eucarióticas

Existen otras estructuras celulares típicamente en las células eucarióticas que son el retículo endoplasmático, aparato de Golgi, lisosomas y peroxisomas. A diferencia de los cloroplastos y ribosomas, estos orgánulos carecen de DNA y de ribosomas, y no son de origen endosimbiótico.

El retículo endoplasmático y el aparato de Golgi

El retículo endoplasmático es una red de membranas que que se comunican con la membrana nuclear. Se reconocen dos tipos de retículo endoplasmático (RE): el *rugoso*, así llamado por tener unidos ribosomas y el *liso* que no los posee (Figura 14.1). El RE liso participa en la síntesis de lípidos y en algunos aspectos del metabolismo de los carbohidratos, mientras que el RE rugoso está implicado en la síntesis de glicoproteínas y también produce nuevo material de membrana que es transportado a través de la célula para alargar el aparato endomembranoso (Figura 14.1) antes de cada división mitótica.

El **aparato de Golgi** está formado por una pila de sacos membranosos (Figura 14.1) que trabaja en concordancia con el RE. En el Golgi, se produce la modificación química y almacenamiento ordenado de las sustancias que han de ser secretadas al exterior celular, tales como hormonas y enzimas digestivas, y aquellas que funcionan en otras estructuras membranosas en la célula.

Lisosomas y peroxisomas

Los lisosomas (Figura 14.1) son sacos membranosos que contienen enzimas digestivas que la célula utiliza para digerir macromoléculas tales como proteínas, grasas y polisacáridos. El pH interno es de aproximadamente 5, es decir, dos unidades inferior al del citoplasma, y las enzimas hidrolíticas en el citoplasma funcionan de manera óptima a ese pH. Como estas enzimas hidrolíticas no presentan especificidad de acción y podrían potencialmente destruir macromoléculas celulares clave, el lisosoma es una estructura que permite que la actividad lítica tenga lugar totalmente separada del propio citoplasma. Después de la hidrólisis de macromoléculas en el lisosoma, los monómeros resultantes se incorporan desde el lisosoma al citoplasma como nutrientes para la célula.

Los peroxisomas son orgánulos también rodeados por una unidad de membrana (Figura 14.1) cuya función es producir agua oxigenada (H_2O_2) por la reducción del O_2 por varios donadores de hidrógeno como alcoholes y ácidos grasos de cadena larga. El H_2O_2 producido es degradado hasta agua y oxígeno por acción de la enzima catalasa (*véase* Sección 6.13). Los peroxisomas también llevan a cabo otras funciones tales como sintetizar sales biliares que ayudan en la digestión y absorción de material lipídico. Los peroxisomas se originan en la célula incorporando sus proteínas y lípidos desde el citoplasma, y finalmente rodeándose de una unidad de membrana que puede crecer y dividirse sincrónicamente con la célula.

Microfilamentos y microtúbulos

El gran tamaño de la célula eucariótica, así como su capacidad para moverse, requiere de refuerzos celulares estructurales. Estos vienen proporcionados por proteínas que se configuran como filamentos y que se denominan *microfilamentos* y *microtúbulos*. Los primeros miden 8 nm de diámetro y son polímeros de *actina*. Estas fibras forman un andamiaje extendido por toda la célula y son las responsables de la morfología celular (Figura 14.1). Los microtúbulos son filamentos de mayor tamaño, alrededor de 25 nm de diámetro, y están constituidos por la proteica *tubulina* también están implicados en el movimiento tanto de estructuras internas (como es la segregación de los cromosomas en la división celular), como de toda la célula (como es el movimiento del flagelo). Este sistema de microfilamentos y microtúbulos constituyen lo que se llama el **citoesqueleto**. Vimos en un capítulo anterior que los procariotas tienen proteínas homólogas a la actina en cuanto a su función, Mreß y Fts2, respectivamente (Sección 6.1). Es decir, el citoesqueleto eucariótico tiene profundas raíces evolutivas.

✓ 14.5 Revisión de conceptos

Además de los orgánulos principales eucarióticos, existen en el citoplasma otros con funciones bien definidas. Éstos incluyen el retículo endoplasmático, el lugar de síntesis de ribosomas y lípidos celulares; el aparato de Golgi, implicado en la secreción; los lisosomas que realizan una función en la digestión de macromoléculas; y los peroxisomas, orgánulos implicados en la producción de agua oxigenada. Además existe un citoesqueleto formado por microfilamentos y microtúbulos.

- ✓ ¿En qué difiere el RE rugoso del RE liso?
- ✓ ¿Por qué es mejor que las actividades que tienen lugar en el lisosoma estén separadas del propio citoplasma?
- ✓ Además de servir de andamiaje, ¿qué otras funciones tienen los microtúbulos?

14.6 Generalidades de la genética de eucariotas

A continuación consideramos brevemente algunos aspectos de la idiosincrasia de la genética en eucariotas, utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo. Las células eucarióticas llevan a cabo reproducción sexual en la que ambas partes donan un gameto para formar un zigoto. Esto difiere fundamentalmente del proceso de apareamiento o conjugación unidireccional de los procariotas (*véase* Capítulo 10); por esta razón nos centraremos en estos aspectos en nuestra explicación.

Mitosis y meiosis

Desde un punto de vista genético, las células eucarióticas pueden existir de dos formas: como haploides o como diploides. Las células diploides tienen dos copias de cada cromosoma y las haploides sólo una. Las células de *S. cerevisiae* pueden existir indefinidamente en forma haploide (vegetativa) con 16 cromosomas. Pero ocasionalmente, dos células haploides pueden conjugar para dar un diploide de 32 cromosomas (Figura 14.8). Sin embargo, estos procesos no deben confundirse con los que tienen lugar en los metazoos tales como plantas o animales. En ellos, la fase diploide es el organismo en sí y la fase haploide se restringe a los gametos.

La mitosis es el proceso que sigue a la replicación del DNA, donde los cromosomas se condensan, se dividen y se separan en dos juegos idénticos para cada célula (*véase* Sección 2.2). En células haploides de *S. cerevisiae* (Figura 14.8), la mitosis ocurre antes de cada división celular y así mantiene 16 cromosomas por célula. **La meiosis** o división reduccional es el proceso por el que se produce la transición de estado diploide a estado haploide. Implica dos divisiones. En la primera, los cromosomas homólogos segregan en células separadas y es cuando tiene lugar el cambio diplo-haploide; la segunda división es esencialmente una mitosis ya que las dos células, ya haploides, se dividen originando un total de cuatro gametos haploides (ascosporas, Figura 14.8).

La conjugación en levaduras: tipos sexuales

Las levaduras tienen dos tipos diferentes de células haploides denominados *tipos sexuales*; éstos pueden considerarse análogos a los gametos femenino y masculino. Cuando con-

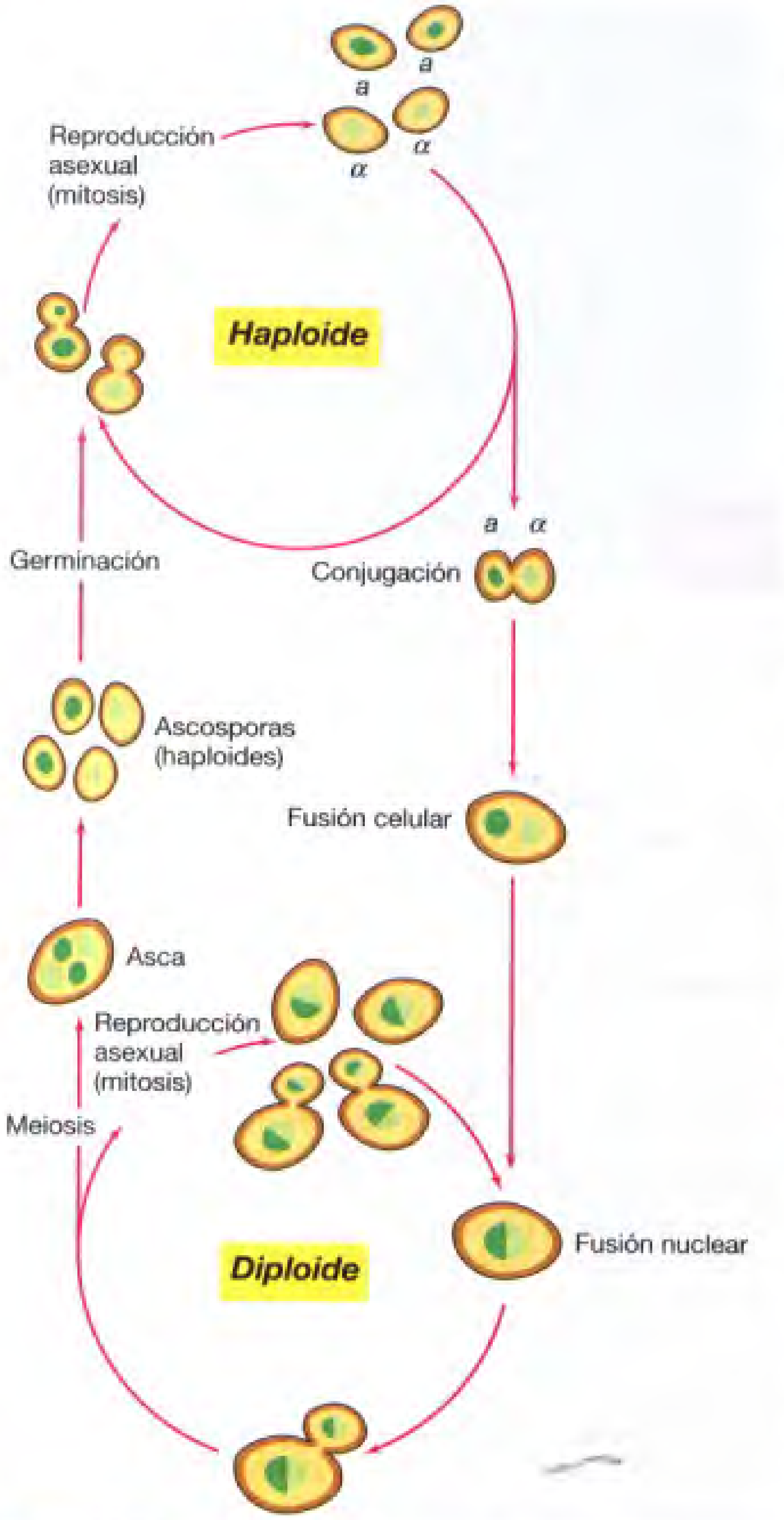

a
a
Reproducción asexual (mitosis)
α
α
Haploide
a α
Germinación
Conjugación
Ascosporas (haploides)
Fusión celular
Asca
Reproducción asexual (mitosis)
Meiosis
Fusión nuclear
Diploide

Figura 14.8 Ciclo biológico de una levadura típica, *Saccharomyces cerevisiae*. Una célula haploide contiene 16 cromosomas.

jugan dos células de tipo sexual opuesto se origina una célula diploide. De una única célula diploide, se forma una estructura que contiene cuatro gametos, dos de cada tipo sexual opuesto. La célula en la que los gametos se forman se denomina *asca*, y las células formadas en el interior del asca (productos meióticos o esporas), se denominan *ascosporas* (Figura 14.8).

Los dos tipos sexuales en *Saccharomyces cerevisiae* se designan con las letras *a* y *α*. Las células de tipo sexual *a* sólo conjugan con células de tipo *α*, y el hecho de que sean células *a* o *α* se controla genéticamente. Algunas cepas haploides de *S. cerevisiae* permanecen *a* o *α*, mientras que otras cepas son capaces de *cambiar* sus tipos sexuales de uno a otro. Este cambio de tipo sexual es debido a una inserción génica y el proceso se ilustra en la Figura 14.9.

Existe una localización única en uno de los cromosomas de *S. cerevisiae* denominado locus MAT (por *mating type*, tipo sexual en inglés), en el que puede estar insertado o bien el gen *a* o *α*. En este locus, el promotor MAT controla la transcripción del gen que esté presente; de modo que si el gen *a* está en el locus, entonces las células son de tipo sexual *a*, mientras que si es el gen *α*, las células son de tipo *α*. En otras partes del genoma de la levadura existen copias silenciosas de estos genes *a* o *α*. Tales *copias silenciosas* son la fuente del gen que se inserta en MAT. Cuando se produce el cambio de tipo sexual (Figura 14.9), entonces el gen apropiado *a* o *α* es copiado de su «sitio» silencioso e insertado en MAT, *reemplazando* el que allí estuviese. Este proceso se ha designado como *mecanismo de casete* ya que *a* o *α* pueden considerarse como casetes que se insertan en un magnetófono; éste reproduce la cinta que se le introduce y poco le importa lo que dice la cinta.

Los genes *a* y *α* de *S. cerevisiae* son genes reguladores. Entre otras proteínas regulan las hormonas peptídicas factor *α* y factor *a*, que son excretadas por las células para la conjugación. Estas auténticas hormonas sexuales se unen a las células de tipo opuesto e inducen cambios en su superficie de tal manera que pueda producirse la fusión celular (Figura 14.10), incluso cariogamia, lo que resulta en la formación de un zigoto. A partir de él, la división reduccional o meiosis regenera los cuatros productos meióticos haploides o formas vegetativas de la levadura (Figura 14.8).

✓ 14.6 Revisión de conceptos

Los organismos eucarióticos pueden conjugar e intercambiar su DNA durante la reproducción sexual. La mitosis asegura la segregación apropiada de los cromosomas durante la división ase-

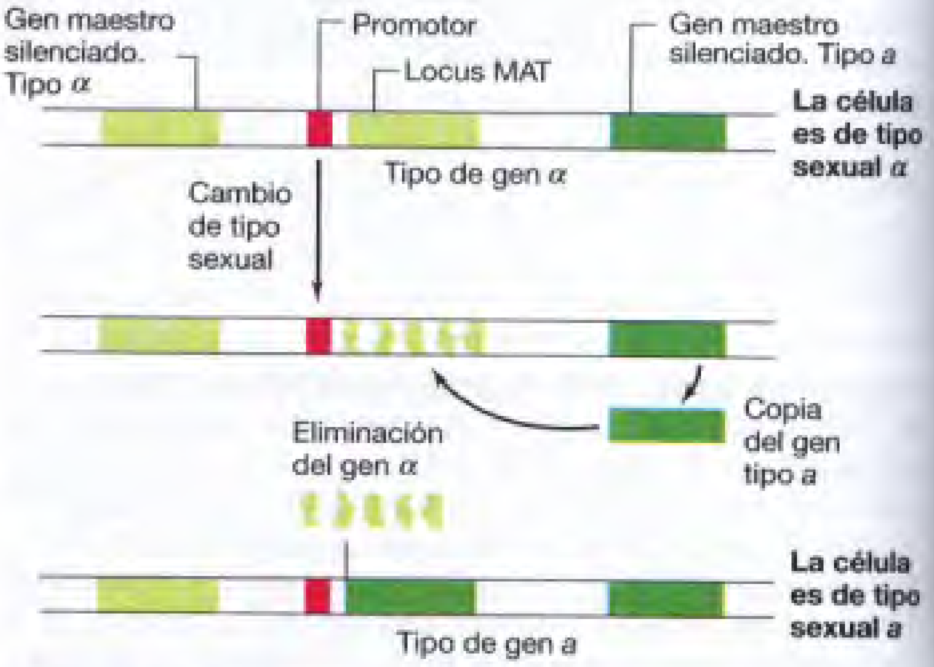

Gen maestro silenciado. Tipo α
Promotor
Locus MAT
Gen maestro silenciado. Tipo a
La célula es de tipo sexual α
Tipo de gen α
Cambio de tipo sexual
Eliminación del gen α
Copia del gen tipo a
La célula es de tipo sexual a
Tipo de gen a

Figura 14.9 El mecanismo del casete implicado en el cambio de tipo sexual de α hasta *a*. Según el casete que se inserte en el locus activo así será un sexo u otro. El proceso es reversible de tal manera que *a* puede revertir hasta α.

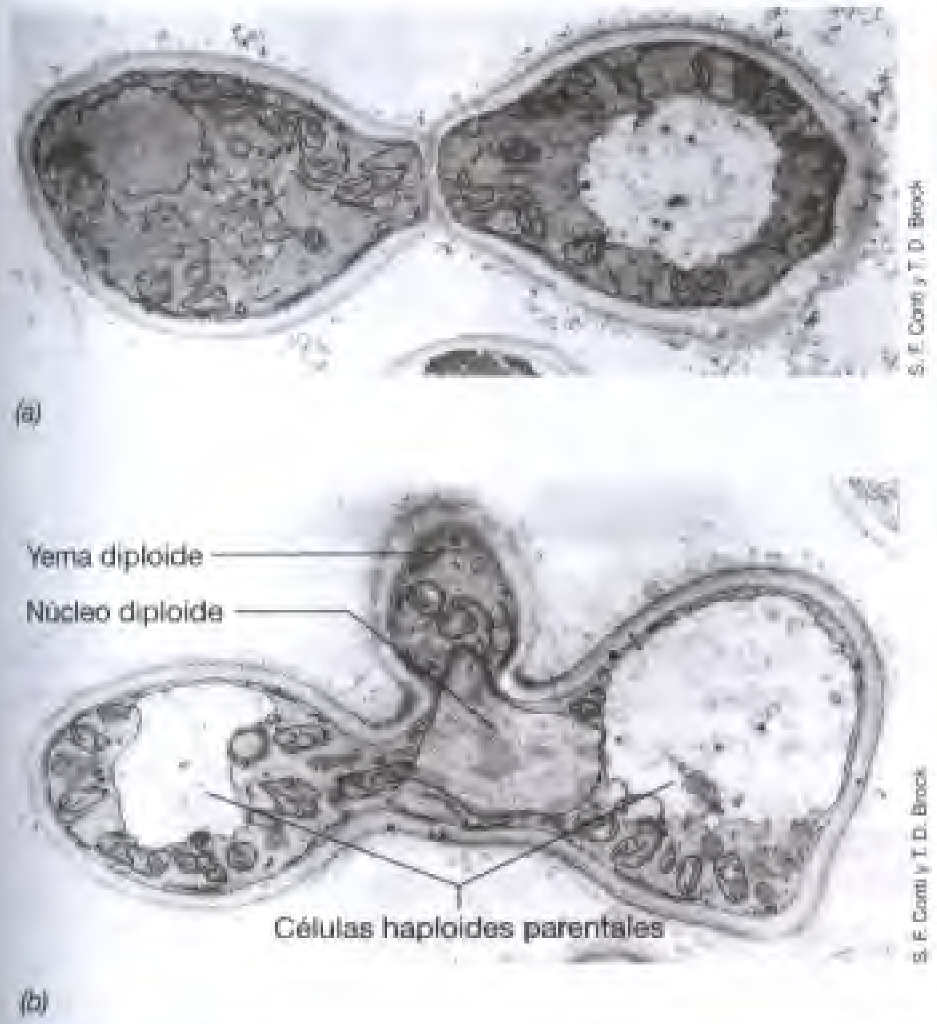

S. F. Conti y T. D. Brock
(a)
Yema diploide
Núcleo diploide
Células haploides parentales
S. F. Conti y T. D. Brock
(b)

Figura 14.10 Micrografía electrónica del proceso de conjugación en la levadura *Hansenula wingei*. (a) Dos células han fusionado en el punto de contacto. (b) Estadio tardío de la conjugación. Ya hay cariogamia y se ha formado la yema diploide en ángulo recto al tubo conjugativo. Esta yema se separará originando un linaje diploide. La célula de *Hansenula* tiene un diámetro aproximado de 10 μm.

xual. Las células haploides, originadas durante la meiosis pueden conjugar para formar un zigoto diploide. Existen dos tipos sexuales en levaduras y las células pueden cambiar de un tipo sexual a otro.

- ✓ ¿Qué microorganismo eucariótico ha sido el modelo para estudiar la genética en eucariotas?
- ✓ Si el número diploide de cromosomas en células humanas es 46, ¿cuántos cromosomas hay en un gameto humano?
- ✓ Explique cómo una única célula haploide de *Saccharomyces* puede dar lugar a una célula diploide.

II DIVERSIDAD MICROBIANA EN EUCARIOTAS

A continuación exploraremos los diversos grupos de microorganismos eucarióticos. Aquí se incluyen los protozoos, los hongos, los hongos mucosos y las algas. Se comienza con una aproximación filogenética en la que veremos cómo, desde el punto de vista filogenético, algunos eucariotas muestran claramente que proceden de otros microorganismos, en tanto que otros parecen haber retenido propiedades clave de eucariotas más antiguos.

14.7 Generalidades filogenéticas de *Eukarya*

En la Figura 11.13 vimos la filogenia de *Eukarya* dentro del contexto del árbol filogenético universal. En este sentido vimos cómo *Eukarya* forma su propio dominio que está más relacionado con *Archaea* que con *Bacteria*. La filogenia de *Eukarya* se deduce por comparación de secuencias del rRNA 18S de ribosomas citoplasmáticos (*véase* Sección 11.5). Pero antes de examinar este aspecto consideraremos brevemente el concepto clásico de la diversidad filogenética.

¿Cinco reinos o tres dominios?

Eukarya ha sido tradicionalmente agrupado en cuatro reinos: *plantas, animales, hongos* y los restantes *Eukarya* microbianos, llamados *protistas*. Antes de la era de la filogenia molecular estos cuatro grupos, junto con los procariotas (que estaban agrupados en una única unidad filogenética), formaban los llamados *cinco reinos de los organismos vivos*. Sin embargo, la secuenciación molecular (*véase* Capítulo 11) ha mostrado que se había sobre valorado la importancia evolutiva de los metazoos (plantas pluricelulares y animales). De hecho, como ya se ha visto (*véanse* Capítulos 11-13), el cuadro evolutivo que ha surgido al comparar las secuencias de RNAs ribosómicos, *los tres dominios de vida celular*, difiere bastante de la hipótesis de los cinco reinos, especialmente en que la mayor diversidad evolutiva del Planeta reside en el mundo *microbiano*.

La Figura 14.11 muestra detalles del dominio *Eukarya*. Vemos cómo varios eucariotas microbianos se encuentran en linajes profundos del árbol, mientras que los metazoos (organismos pluricelulares) son organismos muy evolucionados; observación que se sustenta por la aparición tardía de los metazoos en el registro fósil (*véase* Sección 11.1). Las algas están repartidas por todo el árbol eucariótico (principalmente en linajes relativamente recientes), mientras que los hongos (excepto los Oomicetos) forman un grupo bastante reciente pero muy compacto, filogenéticamente hablando (Figura 14.11).

Los primeros eucariotas

Para los microbiólogos actuales es de gran interés el conocimiento de la identidad de los eucariotas «primitivos» desde el punto de vista evolutivo organismos actuales que son los últimos derivados (evolucionados) de sus antecesores antiguos. El árbol del RNA ribosómico de la Figura 14.11 identifica claramente diplomonas como *Giardia*, microsporidios del género *Encephalitozoon* y tricomonas del género *Trichomonas* como tales «eucariotas ancestrales». Pero, realmente, ¿cuánto se parecen estos organismos actuales a los antiguos eucariotas?

Giardia, Trichomonas y *Encephalitozoon* son eucariotas *sin mitocondrias*: todos tienen un núcleo rodeado por una membrana pero carecen de mitocondrias. Algunos de estos organismos, como es el caso de *Trichomonas*, contienen hidrogenosomas (Figura 14.4), mientras hay otros que no. Por tanto, cabe preguntarse, ¿son estos organismos reliquias actuales de aquellos eucariotas primitivos que nunca sufrieron endosimbiosis? Ésta es una posibilidad, pero los estudios genéticos no apoyan esta hipótesis. Utilizando métodos apropiados se ha podido ver que estos eucariotas carentes de mitocondrias, sí contienen en sus genomas nucleares genes que se originaron en *Bacteria*, como ocurre en los genes mitocondriales (Sección 14.6). Todo ello sugiere que los organismos como *Trichomonas* alguna vez poseyeron endosimbiontes, pero por alguna razón los descartaron, quedando sólo reliquias génicas en el núcleo.

Los microsporidios son un enigma evolutivo. Carecen de *todo* tipo de orgánulos, como el aparato de Golgi e hidrogenosoma y sus genomas son exiguos (el genoma de *Encephalitozoon*, por ejemplo, es de tan sólo 2,9 megabases; es decir, 1,5 megabases más pequeño que el de *E. coli*). De hecho, los microsporidios tienen todas las características de un «eucariota ancestral» potencial. Sin embargo, y como este grupo ha sufrido aparentemente una evolución rápida (como se ve en la línea larga del árbol en la Figura 14.11), su posición filogenética es difícil de asignar en el árbol de la vida. Los datos proteómicos y genómicos de los que se disponen nos cuentan una historia muy diferente, ya que de ellos puede deducirse que los microsporidios son parientes muy próximos a los hongos, aunque hayan podido mantener características básicas de ese «eucariota ancestral».

La pregunta permanece: ¿existen hoy parientes de aquellos eucariotas ancestrales que nunca experimentaron endosimbiosis? Si tales organismos existen, se predice que sus genomas no deben poseer restos de genes bacterianos y que han debido desgajarse muy tempranamente del árbol filogenético basado en la secuencia del rRNA. Si tales organismos existen o no, es algo que los investigadores de los próximos años tendrán que resolver, pero no cabe duda que es un desafío para todos los que estudian la biología básica de los organismos eucarióticos.

✓ 14.7 Revisión de conceptos

Las células eucarióticas constituyen su propia línea evolutiva (el dominio *Eukarya*). Algunos microorganismos eucarióticos, tales como *Giardia* y *Trichomonas*, son especies de ramas originadas muy pronto en la evolución, mientras que en la «copa» eucariótica del árbol se encuentran los organismos pluricelulares de plantas y animales.

- ✓ Desde una perspectiva celular, ¿por qué es equivocada la hipótesis de agrupar en cinco reinos los organismos eucarióticos?
- ✓ Resuma las pruebas que conozca que demuestran que *Giardia* está más próximo a los eucariotas primitivos que una célula humana.

14.8 Protozoos

Géneros clave

Amoeba
Paramecium
Trypanosoma

Los protozoos son microorganismos eucarióticos unicelulares que carecen de pared celular (Figura 14.12). En general, no poseen color y son móviles. Los **protozoos** se distinguen

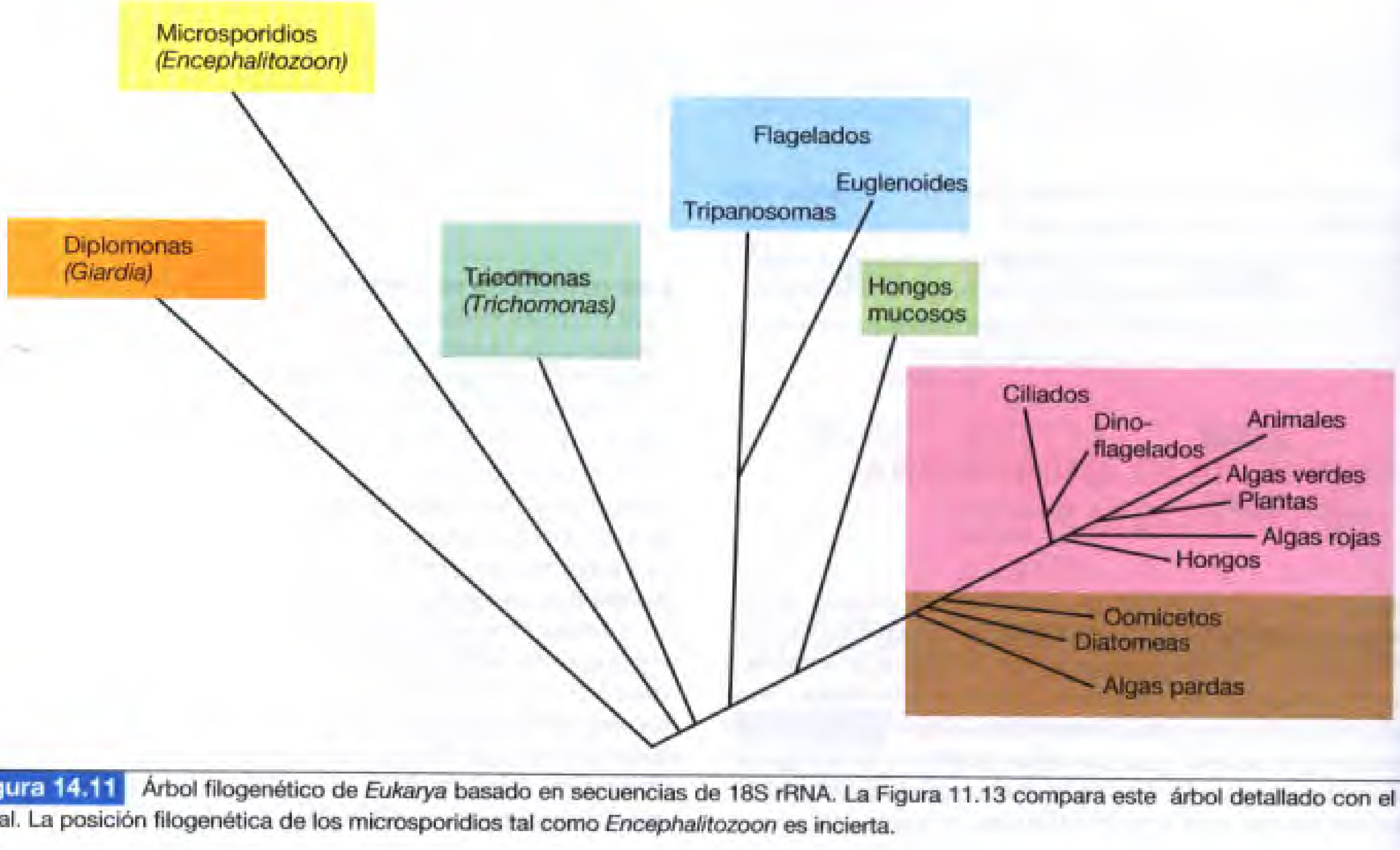
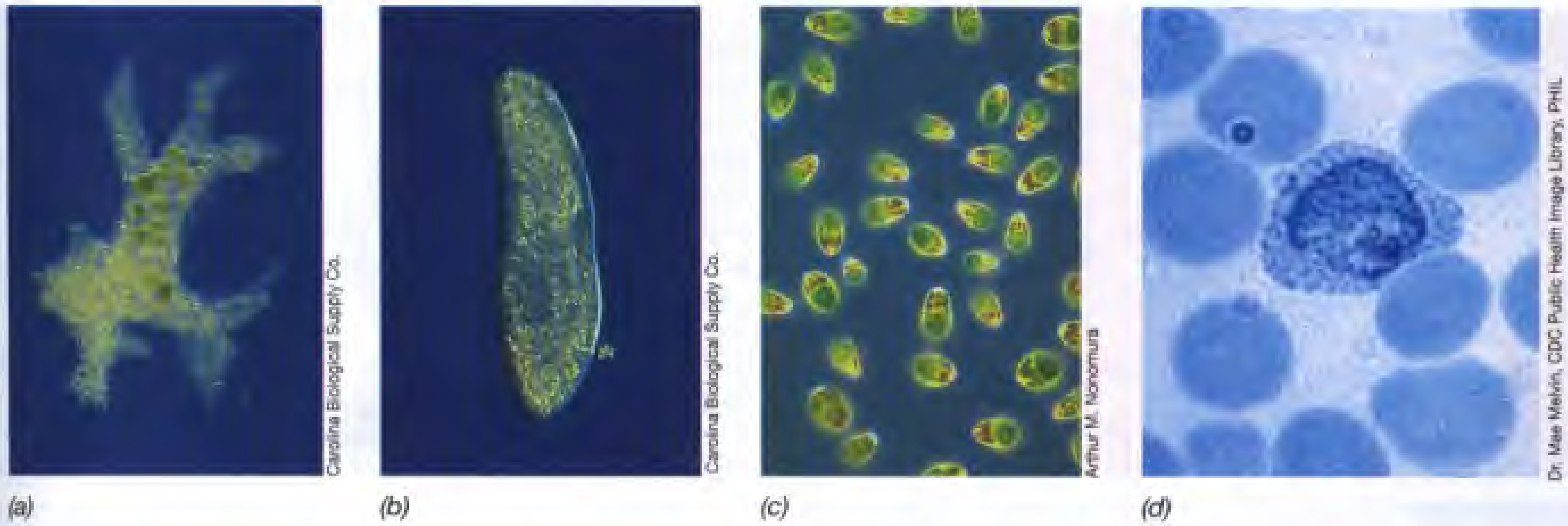


Figura 14.11 Árbol filogenético de *Eukarya* basado en secuencias de 18S rRNA. La Figura 11.13 compara este árbol detallado con el universal. La posición filogenética de los microsporidios tal como *Encephalitozoon* es incierta.



Carolina Biological Supply Co.

Carolina Biological Supply Co.

Arthur M. Nonomura

Dr. Mae Melvin, CDC Public Health Image Library, PHIL

Figura 14.12 Protozoos típicos. (a) *Amoeba*. (b) Un ciliado típico, *Paramecium*. (c) Un flagelado, *Dunaliella* (este flagelado contiene cloroplastos y, por ello, puede considerarse un alga). (d) *Plasmodium vivax*, un esporozoo de apicomplexa creciendo en un eritrocito humano.

fácilmente de los procariotas porque son inconfundiblemente más grandes; de las algas porque carecen de clorofila; de los hongos y levaduras por su movilidad y ausencia de pared celular y de los hongos mucosos por su incapacidad para originar cuerpos fructíferos. Además, los protozoos son filogenéticamente diversos, apareciendo en varios linajes en el árbol de *Eukarya* (Figura 14.11). Los protozoos se encuentran tanto en hábitat de aguas dulces como marinas; un gran número de ellos son parásitos del hombre y otros animales y otros son saprofitos en otros hábitat como el suelo, el aire o la superficie de los árboles.

La mayoría de los protozoos se alimentan por **fagocitosis**, proceso por el que una partícula de alimento es rodeada por una porción de su membrana celular flexible, introduciéndola en la célula. Algunos protozoos pueden «tragar» literalmente bacterias o células eucarióticas pequeñas a través de una estructura especial, más o menos desarrollada, que funciona a modo de boca y que se conoce como citostoma (Figura 14.16).

Como es lógico, y por ser organismos que podríamos considerar como «cazadores», los protozoos son móviles. De hecho, el tipo de movilidad es una de las características que se emplean para dividirlos en grupos taxonómicos (Tabla 14.1). Los protozoos que se mueven por movimientos ameboides se llaman Sarcodina; los que utilizan flagelos, Mastigophora y los que utilizan cilios, Ciliophora. Existe un cuarto grupo Apicomplexa, generalmente inmóviles, que son parásitos de animales superiores.

Mastigophora: los flagelados

Los miembros de este grupo de protozoos son móviles por la acción de flagelos (Figura 14.12*c* y Figura 14.13). Aunque muchos protozoos flagelados son de vida libre, un buen número de ellos son parásitos de animales, incluido el hombre. El más importante de ellos es *Trypanosoma*. Estos organismos causan una serie de enfermedades graves en el hombre, como la *enfermedad del sueño*. En *Trypanosoma*, género que infecta a humanos, el protozoo es bastante pequeño, aproximadamente de 20 μm de longitud, son organismos delgados con forma curvada. El flagelo se origina en un cuerpo basal y se repliega lateralmente a través de la célula quedando rodeado por una ondulación de la membrana de la superficie (Figura 14.13). Tanto el flagelo como la membrana están implicados en el movimiento a través de

TABLA 14.1 Características de los principales grupos de protozoos

Grupo	Nombre común	Representantes típicos	Hábitat	Enfermedades
Mastigophora	Flagelados	*Trypanosoma, Giardia, Leishmania, Trichomonas*	Agua dulce; parásitos de animales	Enfermedad del sueño; giardiasis, leismaniasis
Euglenoides[a]	Flagelados fototrópicos	*Euglena*	Agua dulce; algunos marinos	Ninguna conocida
Sarcodina	Amebas	*Amoeba, Entamoeba*	Aguas dulces y saladas; parásitos de animales	Disentería amebiana (amebiasis)
Ciliophora	Ciliados	*Balantidium, Paramecium*	Agua dulce y marina; parásitos de animales; rumen	Disentería
Apiclomplexa	Esporozoos	*Plasmodium, Toxoplasma*	Parásitos de animales; insectos (vectores)	Malaria, toxoplasmosis

[a] Este grupo es considerado también como algas (*véanse* Sección 14.11 y Tabla 14.3).

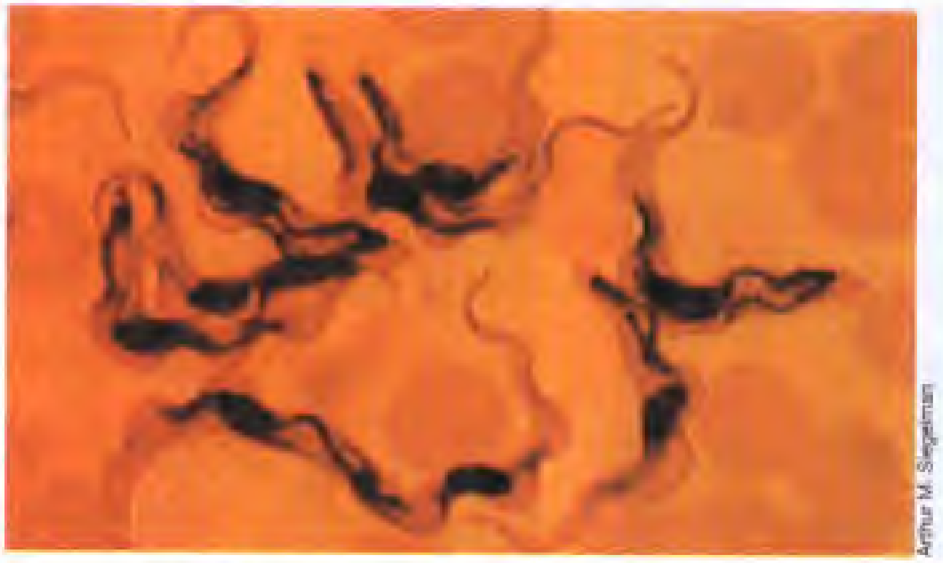

Arthur M. Siegelman

Figura 14.13 Micrografía del protozoo flagelado *Trypanosoma gambiense*, agente causal de la enfermedad del sueño africana, en una extensión de sangre.

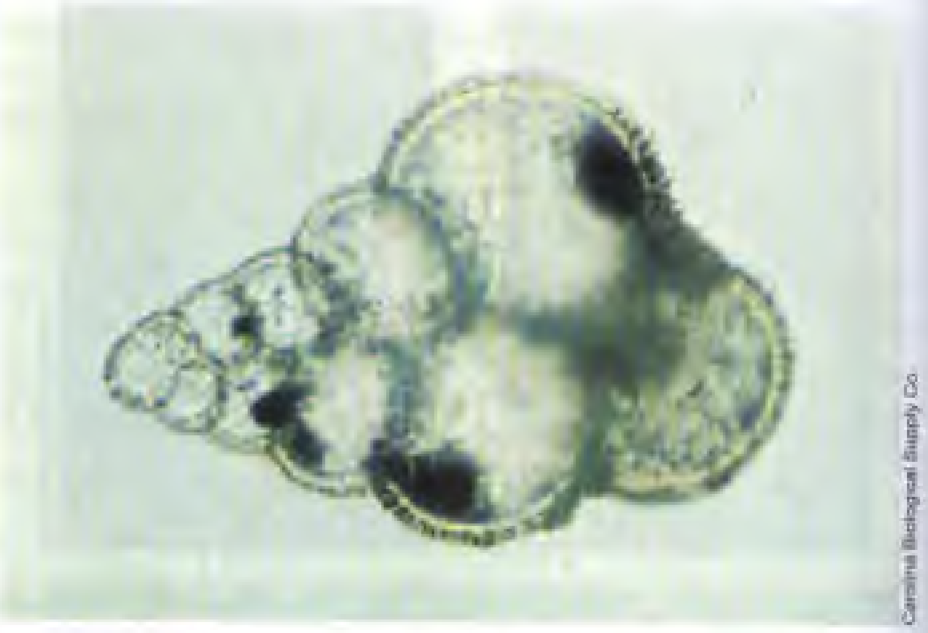

Carolina Biological Supply Co.

Figura 14.14 Amebas con concha: foraminíferos. Nótese la concha multilobulada.

sustancias viscosas, como es el caso de la sangre. *Trypanosoma gambiense* es la especie que produce la enfermedad del sueño africana, una enfermedad crónica y generalmente mortal. En el hombre, el parásito vive y se multiplica inicialmente en el torrente sanguíneo, invade el sistema nervioso central, causando una inflamación del cerebro y de la espina dorsal responsable de los síntomas neurológicos característicos de la enfermedad. El parásito se transmite por la mosca tse-tse *Glossina* que, al contrario que el resto de las moscas, se alimenta chupando la sangre de los animales de sangre caliente y vive en ciertas partes de África. El parásito prolifera en el tracto intestinal de la mosca e invade sus glándulas salivares, desde donde se transmite por picadura al hospedador humano.

En la Sección 14.11, se describen los flagelados *fototróficos*. Éstos son los *euglenoides*, flagelados que contienen clorofila que permite el crecimiento fotosintético. Sin embargo, en la oscuridad *Euglena* (*véase* Figura 14.27*a*) puede sobrevivir y crecer como un quimioorganotrofo y, como tal, es indistinguible de los protozoos. Se conocen muchos euglenoides y son exclusivamente acuáticos; por lo general, se encuentran en aguas dulces siendo saprofitas. A diferencia de otros protozoos flagelados, los euglenoides no son patógenos.

Sarcodina: las amebas

Dentro de las sarcodinas se encuentran organismos como *Amoeba*, que en fase vegetativa se encuentran siempre desnudos; y los foraminíferos (Figura 14.12*a*), amebas que secretan una especie de concha durante el crecimiento vegetativo (Figura 14.14). Se conocen un buen número de amebas «desnudas» parásitas de humanos y otros vertebrados, cuyo hábitat es la cavidad bucal y el tracto intestinal. En estos hábitat, se mueven por movimiento ameboide (Figura 14.15), un mecanismo que también emplean los hongos mucosos (*véase* Sección 14.10). *Entamoeba histolytica* (*véase* Figura 28.13) es un buen ejemplo de amebas parásitas. En muchos casos la infección es asintomática, pero en algunos individuos produce ulceraciones en el tracto intestinal, que produce un estado diarreico denominado *disentería amebiana* (amebiasis). El organismo se transmite de persona a persona como cistos cuando hay contaminación fecal de las aguas o de los alimentos. La etiología y patogénesis de la disentería amebiana se describe en la Sección 28.8.

Las sarcodinas con concha presentan una interesante variedad de formas. Las mejor estudiadas son *los foraminíferos*. Los foraminíferos son organismos exclusivamente marinos, que viven en zonas próximas a las costas. Las conchas, llamadas *testas*, de las diferentes especies tienen diversas características y a menudo están decoradas (ornamentadas) (Figura 14.14). Las testas están hechas de carbonato cálcico y las células no se anclan firmemente a ellas, de modo que la célula puede extenderse cuando se alimenta.

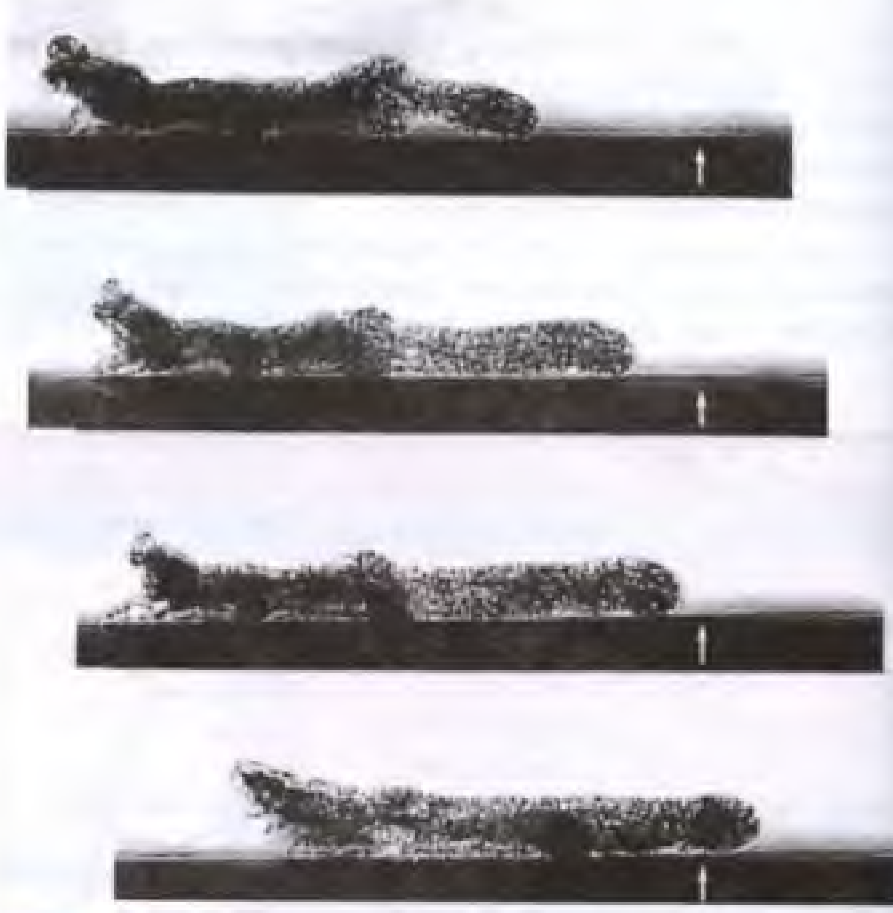


Figura 14.15 Vista lateral de una ameba en movimiento. *Amoeba proteus*, tomado de una película y siendo el intervalo entre cuadros de 2 segundos. Las flechas indican un punto fijo de la superficie. El diámetro celular es aproximadamente de 80 µm.

Debido al peso de la concha, los foraminíferos se hunden hasta el fondo y se piensa que los organismos se alimentan de depósitos particulados en los sedimentos, principalmente bacterias y detritus. Las conchas son bastante resistentes y, por ello, se fosilizan rápidamente (los acantilados de Dover, Inglaterra, son en gran medida conchas de foraminíferos). Debido a que dejan un excelente registro fósil, tenemos una mejor idea de su distribución a través de las edades geológicas que a partir de cualquier otro protozoo.

Ciliophora: los ciliados

Los ciliados son aquellos protozoos que al menos en alguna fase de su vida, poseen cilios (Figura 14.16). Son únicos entre los protozoos y poseen dos clases de núcleo: el *micronúcleo* que está implicado en la herencia y en la reproducción sexual y el *macronúcleo* que está implicado en la formación de diversos mRNAs de crecimiento y otras funciones celulares (Figura 14.17).

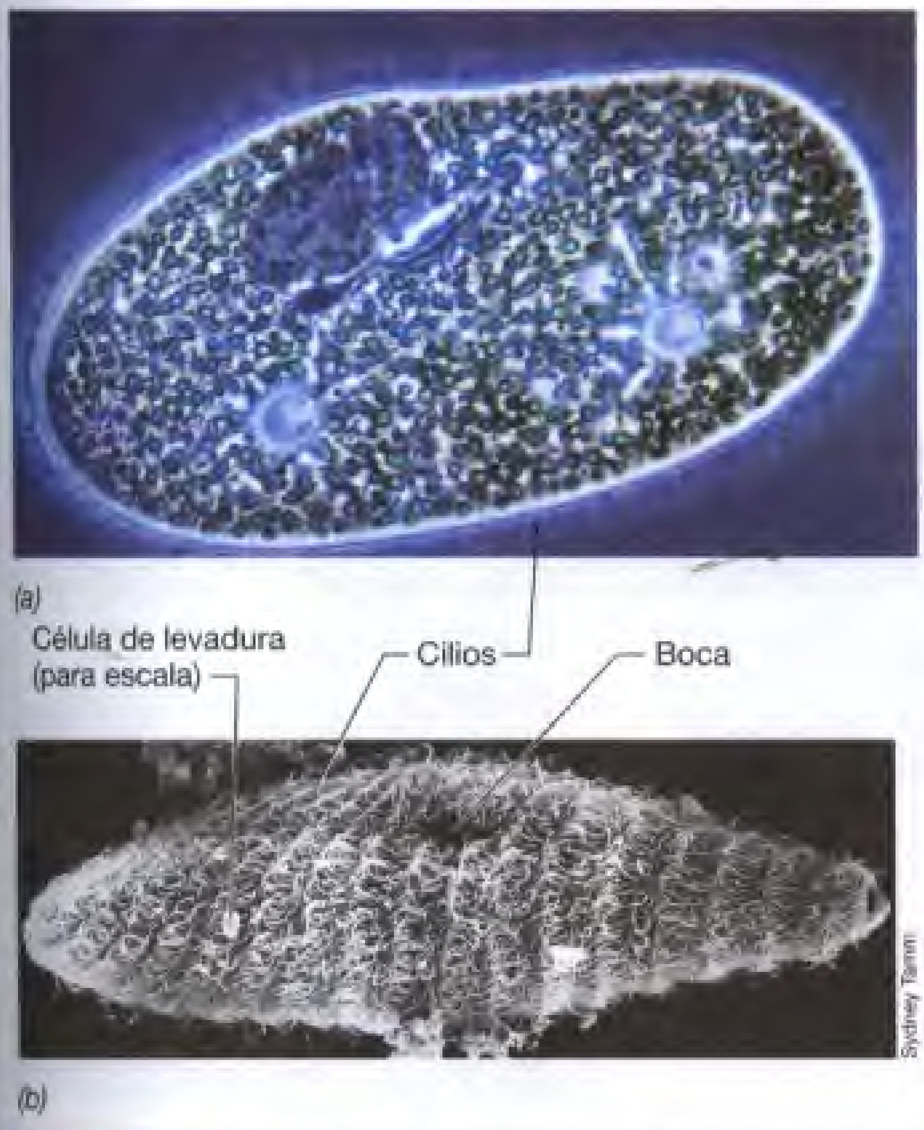
Probablemente, el ciliado mejor estudiado es *Paramecium* (Figura 14.16), que será utilizado aquí como ejemplo del grupo. La mayor parte de los ciliados obtienen su alimento ingiriendo partículas a través de una especie de boca hasta una zona ciliada que es como un esófago (Figura 14.16*b*). Al llegar al citoplasma, la partícula es englobada en una vacuola digestiva en la que se vierten las enzimas digestivas. Además de cilios, muchos ciliados poseen *tricocistos* que son filamentos largos, de naturaleza contráctil anclados debajo de la capa más externa de la célula. Estas estructuras permiten a los protozoos asirse literalmente a sustratos sólidos y también sirven para dar señales de peligro cuando están siendo atacados por otros predadores. En el caso de *Didinium*, los tricocistos paralizan la presa como preludio a la ingestión.

Muchas especies de *Paramecium* (así como muchos otros protozoos) sirven de eficientes hospedadores para bacterias endosimbiontes que viven en su citoplasma o, incluso, dentro del macronúcleo. Existen evidencias de que en muchos casos juegan un importante papel en la nutrición del protozoo, sintetizando vitaminas u otros factores nutricionales, que de lo contrario tendrían que ser obtenidos del medio exterior. En el caso de los protozoos del tracto intestinal de las termitas, poseen un endosimbionte metanogénico que elimina el hidrógeno producido por la oxidación del piruvato en el hidrogenosoma (Figura 14.4); el metano producido es liberado a la atmósfera (*véanse* Sección 19.10 y Figura 19.26*c*).

Aunque algunos ciliados son parásitos, no es ésta una forma de vida habitual en el grupo. La especie *Balantidium coli* (Figura 14.17) es primariamente una especie parásita de animales domésticos, pero ocasionalmente infecta el intestino de humanos dando lugar a cuadros disentéricos que pueden confundirse con *Entamoeba histolytica*. Además, existe una fauna característica de ciliados *anaerobios obligados* en el rumen (Sección 19.11); estos protozoos juegan un papel beneficioso en los procesos digestivos y fermentativos que ocurren allí.

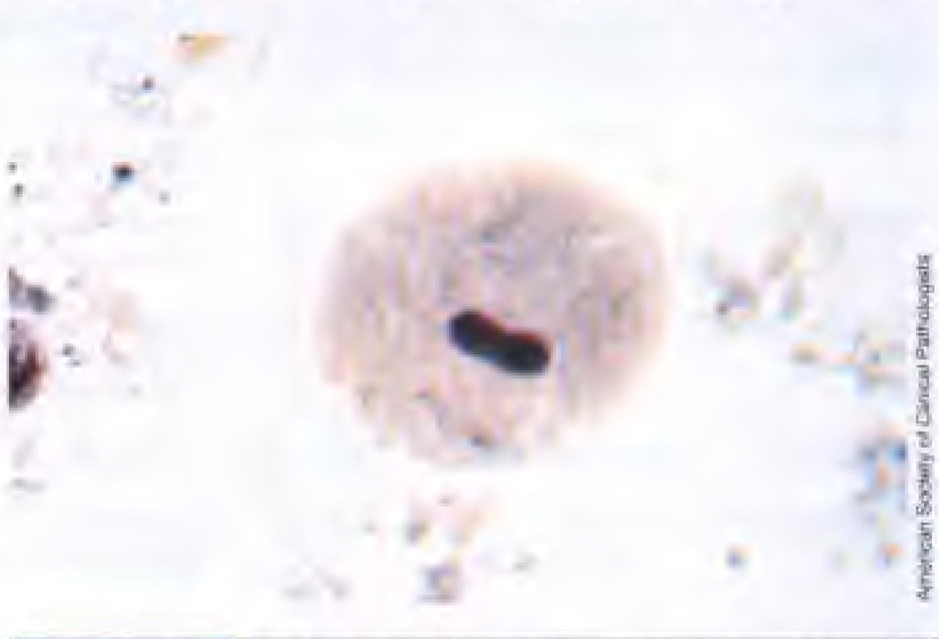
Apicomplejos (esporozoos)

Los apicomplejos o *esporozoos* (Figura 14.12*d*) es un gran grupo de protozoos que son parásitos obligados. Se caracterizan por ser *inmóviles* en estado adulto y porque los alimentos los toman disueltos en fase acuosa a través de las envueltas celulares como ocurre en los procariotas y hongos. Aunque el nombre *esporozoos* implica la formación de esporas, estos organismos no las forman; no al menos en el sentido en que se entiende este tipo de formaciones para procariotas u hongos, en su lugar originan formaciones semejantes que se llaman *esporozoitos*, que están implicados en



Sydney Tamm

Figura 14.16 *Paramecium*, un protozoo ciliado. (a) Micrografía de contraste de fases. (b) Micrografía de barrido. Nótense los cilios en ambas fotografías. El diámetro es aproximadamente de 60 µm.



American Society of Clinical Pathologists

Figura 14.17 *Balantidium coli*, un protozoo ciliado que causa disentería en humanos. La estructura teñida de azul oscuro es el macronúcleo.

la transmisión a nuevo hospedador. Tanto animales vertebrados como invertebrados pueden ser hospedadores de los esporozoos e incluso en algún caso pueden tener lugar fases alternas. Los miembros más importantes de esporozoos son los coccidios, normalmente parásitos de pájaros y los plasmodios (parásitos de la malaria) (Figura 14.12*d*) que infectan pájaros y mamíferos incluyendo el hombre. Debido a que la malaria es la principal enfermedad humana, especialmente en países en vías de desarrollo, se le dedicará una descripción importante en la Sección 27.5

✓ 14.8 Revisión de conceptos

Los protozoos son *Eukarya* unicelulares que carecen de pared celular y generalmente móviles. Muchos protozoos son patógenos de humanos y de otros animales.

- ✓ Liste al menos dos formas en que difieren *Paramecium* y *Trypanosoma*.
- ✓ ¿En qué difieren los Esporozoos de otros protozoos?
- ✓ ¿Por qué se considera a *Euglena* un protozoo?

14.9 Hongos

Géneros clave

Penicillium
Aspergillus
Saccharomyces
Candida

Al contrario que los protozoos, los hongos poseen pared celular y esporas de diversos tipos y forman un grupo coherente filogenéticamente hablando (Figura 14.11). Se reconocen tres grandes grupos: *mohos* u *hongos filamentosos*, las *levaduras* y las *setas*.

Los hábitat de los hongos son bastante diversos. Algunos son acuáticos, principalmente de agua dulce, aunque existen también algunos de medios marinos. La mayoría de ellos son de medios terrestres, crecen en suelos o sobre materia orgánica en descomposición y contribuyen notablemente a la mineralización del carbono orgánico. Un gran número de hongos es parásito de plantas terrestres. De hecho, los hongos causan pérdidas económicas muy notables en la producción hortofrutícola (Tabla 14.2). Algunos hongos son parásitos de animales, incluido el hombre, aunque, en general, desde este punto de vista, son mucho menos importantes que las bacterias o los virus (*véase* Sección 27.7).

Paredes celulares y metabolismo

Las paredes fúngicas se parecen a las de las plantas, pero sólo desde el punto de vista de su arquitectura y no desde la composición química. Aunque la celulosa está presente en ciertos hongos, muchos de ellos poseen paredes no celulósicas. La **quitina**, un polímero de N-acetil-D-glucosamina (*véase* Figura 3.5) es un constituyente común de las paredes celulares fúngicas. Se dispone en grupos de microfibrillas como la celulosa y en algunas especies existen otros polímeros como mananos, galactanos o quitosán. En su 80-90%, las paredes celulares fúngicas están compuestas de polisacáridos, mientras que los lípidos, polifosfatos e iones inorgánicos forman una matriz cementante. El conocimiento de la pared celular fúngica es muy importante por la aplicación biotecnológica de estos organismos (*véase* Capítulo 30) y, además, porque su naturaleza química se ha usado en la clasificación de los hongos.

Los hongos son típicamente quimioorganotrofos y tienen pocos requerimientos nutricionales. Muchas especies pueden crecer en ambientes extremos con bajos pHs o altas temperaturas de hasta 62°C y esto, junto con la ubicuidad de las esporas fúngicas, hace que sean los contaminantes más frecuentes de alimentos, medios de cultivo microbianos etc. Sin embargo, los mohos y las levaduras no son clasificados sobre bases fisiológicas, sino por sus diferentes ciclos celulares que incluyen la formación de una gran diversidad de esporas (*véase* Tabla 14.2).

TABLA 14.2 Clasificación y principales propiedades de los hongos[a]

Grupo	Nombre común	Hifas	Representantes típicos	Tipos de esporas sexuales	Hábitat	Enfermedades
Ascomicetos	Hongos	Septadas	*Neurospora*, *Saccharomyces*, *Morchella*, etc.	Ascospora	Suelo, materia vegetal en descomposición	Tizón del castaño, ergot, podedumbre
Basidiomicetos	Setas	Septadas	*Amanita* (venenosa) *Agaricus* (comestible)	Basidiospora	Suelo, materia vegetal en descomposición	Tallo negro, trigo, maíz, etc.
Zigomicetos	Hongos del pan	Cenocíticas	*Mucos*, *Rhizopus* (deterioro de alimentos)	Zigospora	Suelo, materia vegetal en descomposición	Deterioro de alimentos. Raramente implicados en enfermedades parasitarias
Oomicetos	Hongos acuáticos	Cenocíticas	*Allomyces*	Oospora	Acuáticos	Ciertas enfermedades de los peces
Deuteromicetos	Hongos imperfectos	Septadas	*Penicillium*, *Aspergillus*, *Candida*	Ninguna	Suelo; material vegetal en descomposición, piel de animales	Incluyen parásitos de plantas y animales (pie de atleta, dermatomicosis, infecciones sistémicas) (*Candida*)

[a] Con excepción de los oomicetos, que son filogenéticamente distintos, los otros grupos de hongos están muy relacionados entre sí (*véase* Figura 14.11).

Hongos filamentosos: mohos

Los mohos son *hongos filamentosos*. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se ven frecuentemente sobre pan viejo, queso o frutas. Cada filamento crece fundamentalmente en el extremo por un mecanismo de extensión celular (Figura 14.18). Cada filamento se denomina *hifa*. Las hifas crecen en masa en lo que se denomina *micelio*, que puede verse fácilmente sin ayuda del microscopio. En la mayoría de los casos, las hifas fúngicas contienen más de un núcleo —a veces cientos de núcleos—. Por tanto, una hifa típica es como un tubo nucleado con citoplasma (referida como *cenocítica*).

A partir del micelio, otras hifas buscan la superficie donde forma esporas o **conidios** (Figura 14.18*a*). Los conidios son esporas *asexuales* (su formación *no* implica la fusión de gametos), a menudo muy pigmentadas (Figura 14.19*a*; Figura 10.1*a*) y resistentes a la desecación, que sirven como forma de dispersión del hongo en nuevos hábitat. Cuando se forman los conidios, cambia el color blanco del micelio adquiriendo el de éstos que puede ser negro, rojo, azul-verdoso, amarillo o marrón. La presencia de esas esporas da a la masa micelial la apariencia de ser una capa de polvo (Figura 14.19*a*).

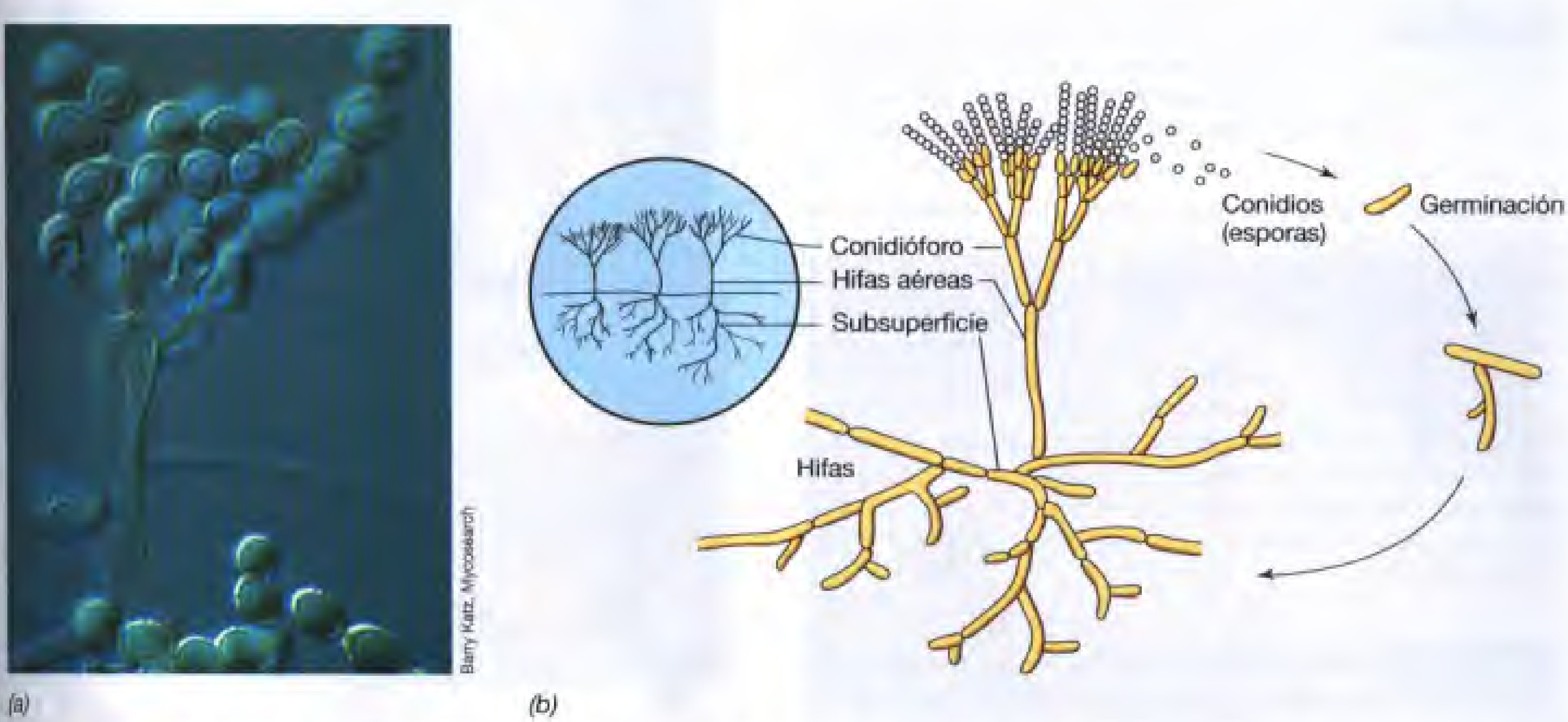
Algunos mohos también producen esporas *sexuales*, formadas como resultado de una reproducción sexual (Tabla 14.2). Esta se produce por fusión de gametos unicelulares o bien de hifas especializadas llamadas *gametangios*. Alternativamente, las esporas sexuales se pueden originar de la fusión de dos células haploides que sufren meiosis y mitosis para dar esporas individuales. Dependiendo a qué grupo pertenezca el hongo en cuestión (*véase* Tabla 14.2) se pueden formar diversos tipos de esporas sexuales. Cuando se forman dentro de un saco o asca se denominan *ascosporas* (*véase* Figura 14.8) y si se forman en los extremos de estructuras en forma de porra se denominan *basidiosporas* (Tabla 14.2). Las *zigosporas* producidas por los zigomicetos como es *Rhizopus* son estructuras macroscópicamente visibles. Eventualmente, la zigospora madura y produce esporas asexuales que son dispersadas en el aire y germinan para dar un nuevo hongo.

Las esporas sexuales de los hongos son generalmente resistentes a la desecación, congelación y a algunos compuestos químicos. No son tan resistentes como las endosporas bacterianas (*véase* Sección 4.15). Tanto una espora sexual como asexual puede germinar para originar un nuevo micelio.

Una actividad ecológica muy significativa de los hongos es la descomposición de la madera, papel, tela y otros productos derivados de fuentes naturales, utilizando estos productos como fuentes de carbono y de energía. La lignina es un polímero complejo en el que las unidades son compuestos fenólicos. Es una parte muy importante de las plantas leñosas y junto con la celulosa proporciona rigidez a la planta. La descomposición de la lignina en la naturaleza se produce casi exclusivamente a través de la acción de ciertos basidiomicetos que producen «la podredumbre de la madera». Se conocen dos tipos: *podredumbre marrón* en la que se degrada la celulosa, pero no la lignina y *podredumbre blanca* en la que se descomponen ambos polímeros. Los hongos que producen esta última forma de podredumbre son muy importantes, ya que están activamente implicados en la descomposición del material leñoso de los bosques.

Hongos macroscópicos: las setas

Las setas son basidiomicetos filamentosos que forman *cuerpos fructíferos*, que constituyen la parte comestible que llamamos setas (Figura 14.20*a*-c). En la sección 30.14 se expondrá el crecimiento comercial de las setas como fuente



Barry Katz, Mycosearch

Figura 14.18 Estructura de un hongo filamentoso y crecimiento. (a) Micrografía de un hongo típico. Los conidios se visualizan como estructuras esféricas en el extremo de las hifas aéreas. (b) Diagrama de un ciclo biológico.

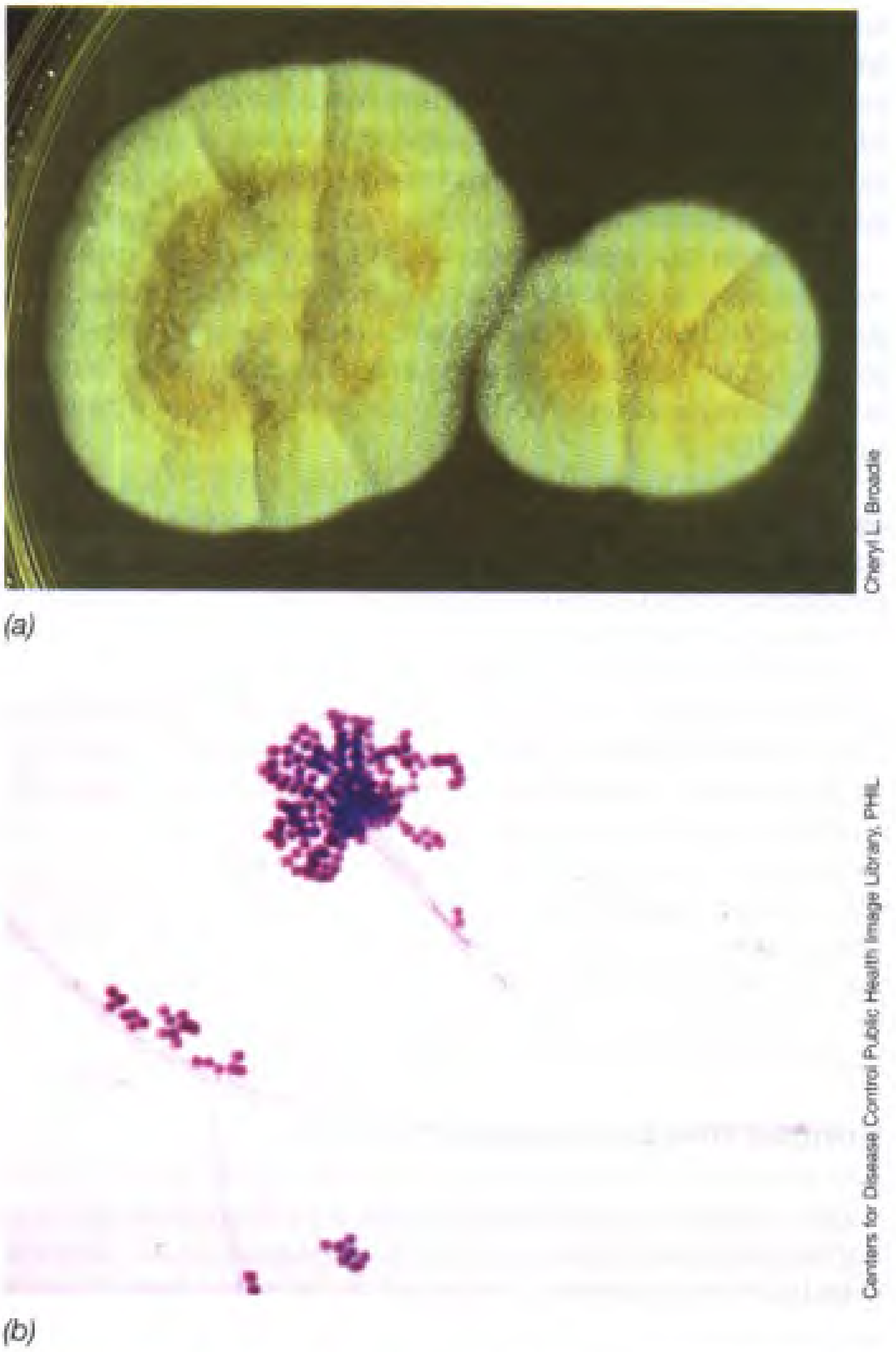

(a)
Cheryl L. Broadie
(b)
Centers for Disease Control Public Health Image Library, PHIL

Figura 14.19 Hongos. (a) Colonias de una especie de *Aspergillus* creciendo en una placa de agar. Nótese el micelio y la presencia de esporas asexuales que le dan apariencia pulverulenta (*véase* Figura 14.18*b*). (b) Conidióforos y conidios de *Aspergillus fumigatus*.

de alimento. Durante la mayor parte de su existencia las setas viven como simple micelio, creciendo en el suelo, en los desechos de hojas o en los troncos. Sin embargo, cuando las condiciones del medio son favorables, generalmente periodos húmedos y fríos, se desarrollan las setas, primero como un pequeño botón y después rompiendo la superficie como seta madura (Figura 14.20*c*). Las esporas sexuales llamadas **basidioporas** (Figura 14.20*d*) se forman en la parte inferior del sombrerillo entre innumerables **laminillas** (*véase* Figura 14.20*b*, *c*). Las basidiosporas son dispersadas por el viento para empezar un nuevo ciclo (Figura 14.20*b*).

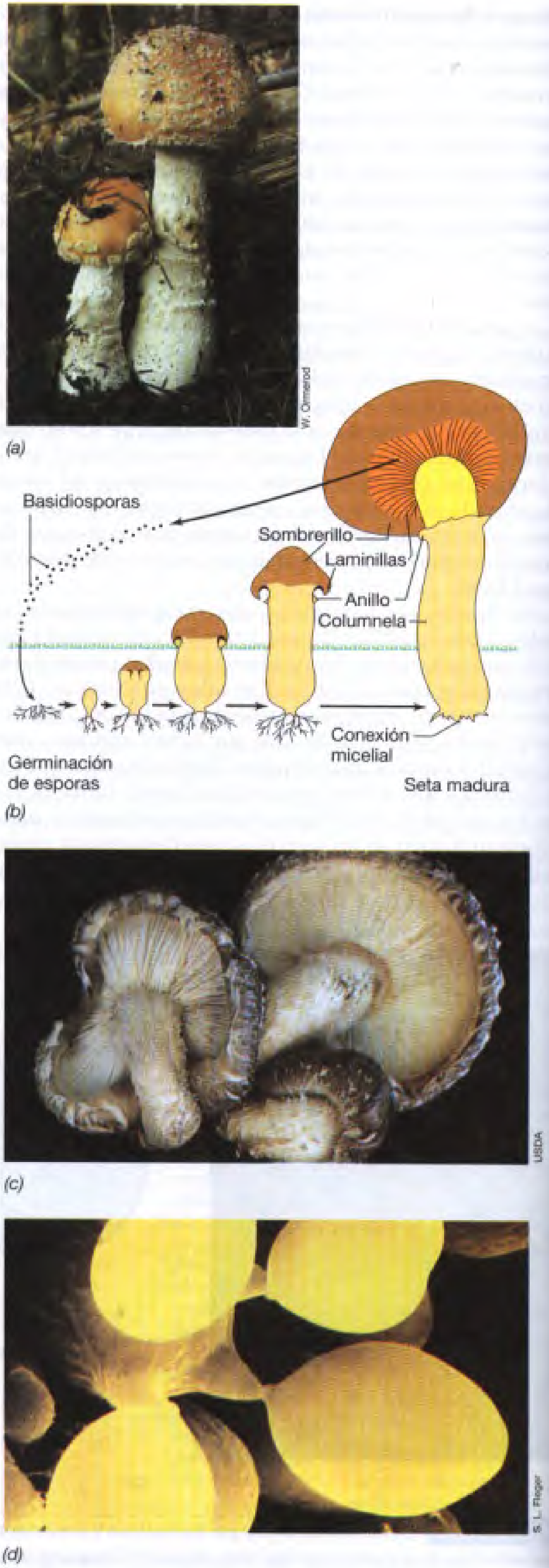

W. Ormerod
(a)
Basidiosporas
Sombrerillo
Laminillas
Anillo
Columnela
Conexión micelial
Germinación de esporas
Seta madura
(b)
USDA
(c)
S. L. Flegel
(d)

Figura 14.20 Setas. (a) *Amanita*, seta muy venenosa. (b) Laminillas en la parte inferior del sombrerillo que contienen los basidios con las esporas. (c) Ciclo biológico de una seta típica. (d) Micrografía electrónica de barrido de las basidiosporas liberadas de setas. La producción de setas como fuente de alimento se discutirá en la Sección 30.14.

Hongos unicelulares: las levaduras

Las levaduras son *hongos unicelulares*, la mayoría perteneciente a los Ascomicetos. Normalmente son ovales, esféricas o casi cilíndricas y la división es, casi siempre, asimétrica o por *gemación* (Figura 14.21). En este proceso, la nueva célula se forma como un pequeño bulto en la célula madre que crece hasta separarse de ella (Figuras 14.21 y 14.22). Aunque la mayoría de las levaduras se reproducen como células aisladas, bajo ciertas condiciones pueden filamentar. Por ejemplo, la fase filamentosa es esencial para la patogenicidad de *Candida albicans*, una levadura que puede causar infecciones bucales, vaginales o de pulmones, e incluso, en el caso de enfermos de SIDA, daño sistémico tisular (*véase* Sección 26.14).

Las células de levaduras son mucho más grandes que las bacterias y pueden distinguirse de ellas no solamente por su tamaño sino también por poseer sistemas membranosos intracitoplasmáticos así como núcleo (Figura 14.22). Algunas levaduras poseen reproducción sexual por *conjugación* en la que se fusionan dos células. La célula resultante es un *zigoto verdadero* y de él emergen esporas sexuales por reducción meiótica. Ya se discutió en la Sección 14.6, el ciclo sexual de la levadura típica *Saccharomyces* (*véase* Figuras 14.8 y 14.9).

Las levaduras prosperan típicamente en hábitat con azúcares, tales como frutos, flores y cortezas de los árboles. Un buen número vive simbionte con animales, especialmente insectos y algunas son patógenas para animales incluido el hombre (*véase* Sección 27.7). La levadura más conocida es *Saccharomyces cerevisiae* (*véase* el cuadro del Capítulo 5, Los productos de la fermentación de la levadura). El hábitat original de estas levaduras son indudablemente las frutas y zumos de frutas, pero las levaduras comerciales de hoy en día son muy diferentes de su ancestro silvestre, ya que ha sido manipulada por el hombre voluntaria o involuntariamente durante los últimos 7000 años. Fue el primer eucariota cuyo genoma se secuenció por vez primera (*véase* Sección 15.6).

✓ 14.9 Revisión de conceptos

Los hongos incluyen los mohos y levaduras y como grupo difiere de los protozoos en virtud de su pared celular rígida, producción de esporas, carencia de movilidad y posición filogenética. Las setas son estructuras, generalmente grandes y son los cuerpos fructíferos que contienen las basidiosporas.

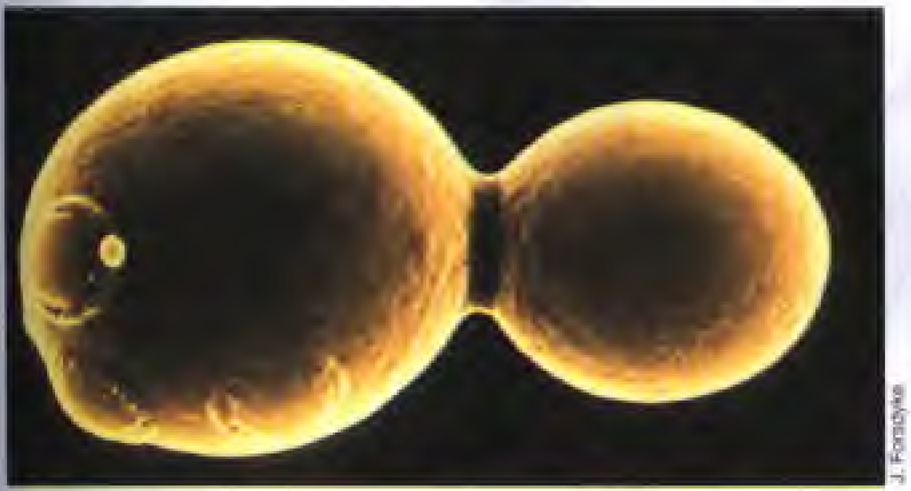

J. Forsdyke

Figura 14.21 Micrografía electrónica de barrido de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Nótese la división asexual por gemación (asimétrica) y cicatrices de gemaciones previas. El diámetro es de 8 µm.

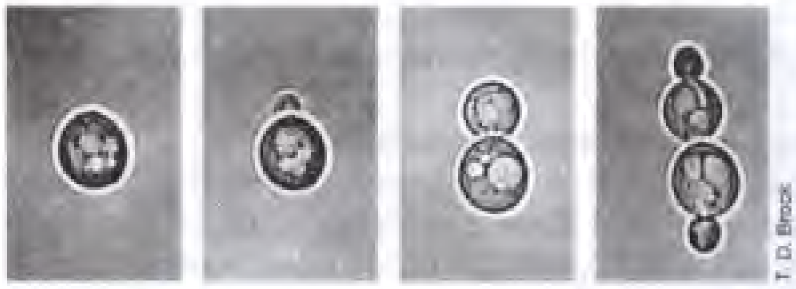

T. D. Brock

Figura 14.22 Crecimiento y división por gemación de *Saccharomyces cerevisiae* observada al microscopio de contraste de fases. Nótese lo pronunciado del núcleo. El diámetro es aproximadamente de 8 µm.

- ✓ ¿En qué difieren los *mohos* de las *levaduras*?
- ✓ ¿Qué es la *quitina* y cuál es su función en los hongos?
- ✓ ¿En qué difieren los *conidios* de las *ascosporas*?

14.10 Hongos mucosos

Géneros clave

Dictyostelium
Physarum

Los **hongos mucosos** son microorganismos eucarióticos que poseen similitudes fenotípicas con hongos y protozoos. Como los primeros, pueden producir esporas y como los protozoos pueden moverse por superficies con un movimiento flexible a modo de amebas (*véanse* Figuras 14.23-14.25). Desde una perspectiva filogenética, los hongos mucosos son más antiguos que hongos y protozoos tales como los ciliados, pero más derivados que los flagelados (Figura 14.11).

Los hongos mucosos pueden dividirse en dos grupos: los *celulares* (semejantes a amebas) y los *acelulares*, que son masas amorfas de protoplasma que llamamos *plasmodios*. Algunos hongos mucosos viven principalmente en material vegetal en descomposición, tales como restos de hojas, troncos, etc. (Figura 14.23). Su alimento suele ser otros microorganismos, especialmente bacterias que ingieren por fagocitosis. Pueden mantenerse durante mucho tiempo en

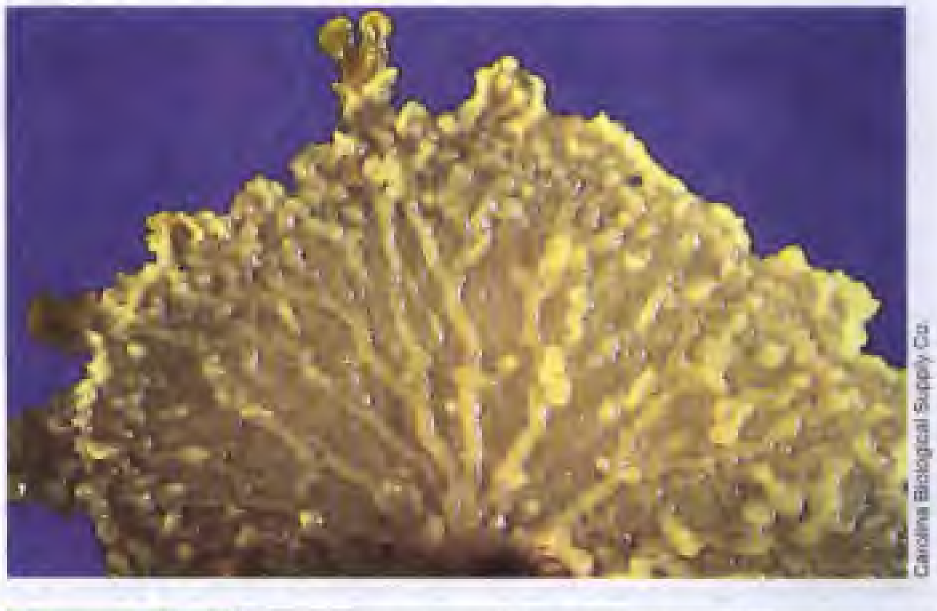

Carolina Biological Supply Co.

Figura 14.23 Hongos mucosos. Plasmodio de un hongo mucoso acelular (*Physarum*) creciendo sobre la superficie de agar.

fase vegetativa o, por diversas razones, desarrollar esporas que al germinar regeneran el estado ameboideo.

Hongos mucosos acelulares

En la fase vegetativa, hongos mucosos acelulares tales como *Physarum* existen como una masa protoplásmica de tamaño indefinido (Figura 14.23). Esta forma o plasmodio es móvil por *movimiento ameboideo* englobando por fagocitosis las partículas de alimento a medida que se mueve. Este peculiar movimiento es el resultado de las corrientes citoplasmáticas que empujan contra un extremo del plasmodio que es menos viscoso y, lógicamente, la corriente sigue el camino de mínima resistencia. Estas corrientes, como en el resto de microorganismos eucarióticos que las poseen, están facilitadas por microfilamentos que forman una delgada capa debajo de la membrana citoplasmática (Sección 14.4 y Figura 14.1). En hongos mucosos acelulares, las corrientes citoplasmáticas forman unas bandas bien definidas y cada una rodeada de una delgada membrana citoplasmática (Figura 14.23). Las corrientes en sí mismas son unos mecanismos de distribución celular de los metabolitos.

El plasmodio de hongos mucosos (Figura 14.23) es diploide. A partir de esta masa protoplásmica, se produce un esporangio y esporas haploides. Bajo condiciones favorables las esporas germinan y producen una forma natatoria. La fusión de dos de estas formas regenera el plasmodio diploide (Figura 14.23).

Hongos mucosos celulares: Dictyostelium

Dictyostelium discoideum es un hongo mucoso celular que tiene un ciclo de vida muy característico en el que las células vegetativas se agregan, migran como una masa y eventualmente producen cuerpos fructíferos en los que las células se diferencian y forman esporas (Figuras 14.24 y 14.25). A medida que sus células entran en fase de deprivación, se agregan para formar un *seudoplasmodio*, una estructura en la que las células pierden su individualidad pero no se fusionan (Figuras 14.24 y 14.25). Esta agregación se inicia por la producción de adenosinmonofosfato cíclico (cAMP) y una glicoproteína; ambos funcionan como agentes quimiotácticos (*véase* Sección 8.7). Aquellas células que son las primeras en producir estos compuestos, sirven como centros de atención de otras formas vegetativas lo que conduce a la formación de una masa que se mueve coordinadamente (Figura 14.24).

A partir de esta masa, emerge un cuerpo fructífero cuando cesa el movimiento de la misma y se pone en posición vertical (Figuras 14.24 y 14.25). El cuerpo fructífero consta de dos partes un pedúnculo y una cabeza. Las células en la parte delantera de la masa se diferencian en pe-

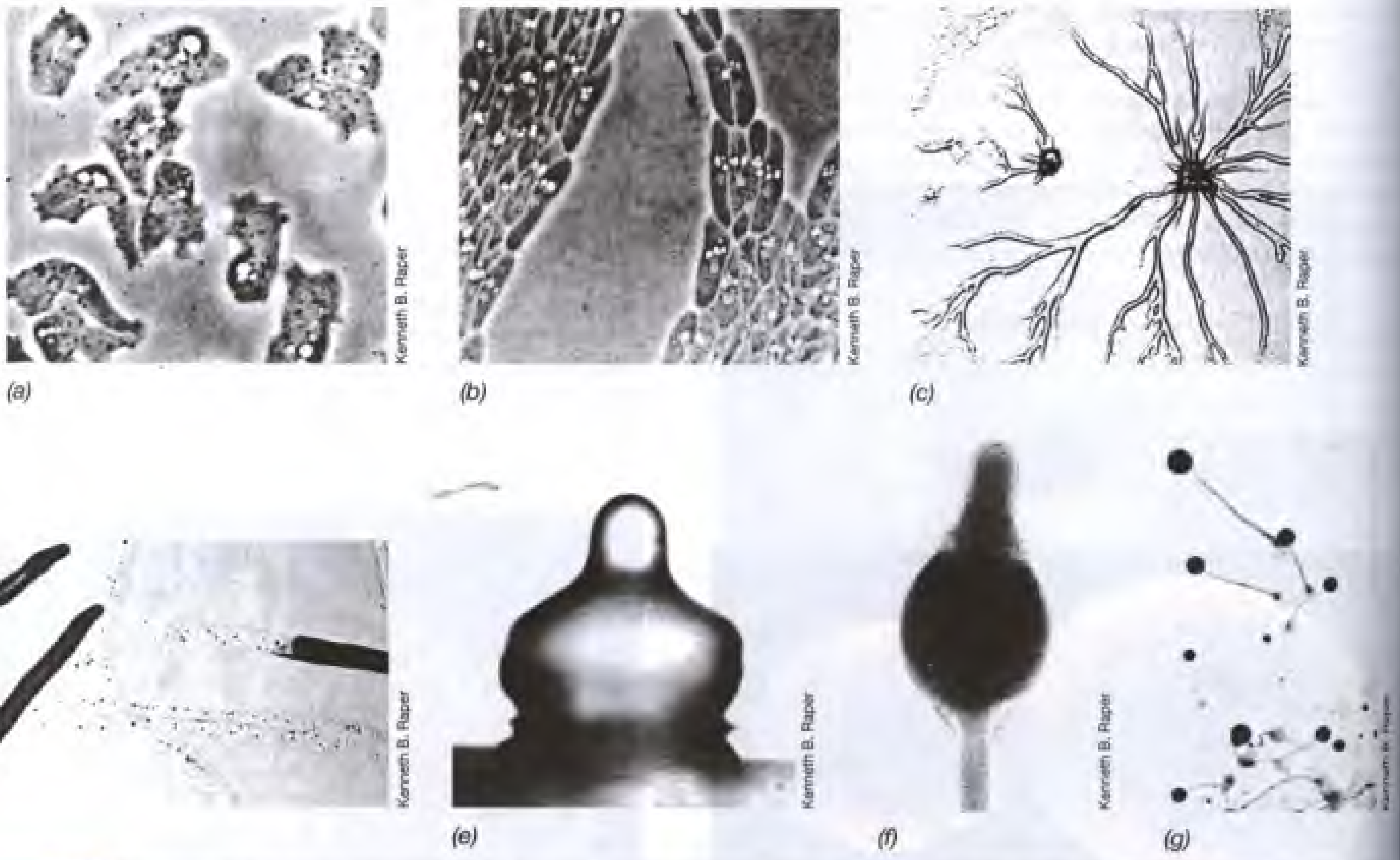


Figura 14.24 Micrografías de varios estadios del ciclo biológico del hongo mucoso *Dictyostelium discoideum*. (a) Amebas en estado preagregativo. Nótese la forma irregular y la ausencia de orientación. (b) Amebas agregantes. Nótese la forma regular y la orientación. Las células se mueven en corrientes en una dirección. (c) Amebas agregantes observadas a baja resolución. (d) Migración de seudoplasmodios moviéndose sobre la superficie del agar dejando pistas de moco tras de sí. (e, f) Cuerpo fructífero en estadio temprano de desarrollo. (g) Cuerpos fructíferos maduros. *Véase* Figura 14.25 para el tamaño de estas estructuras.

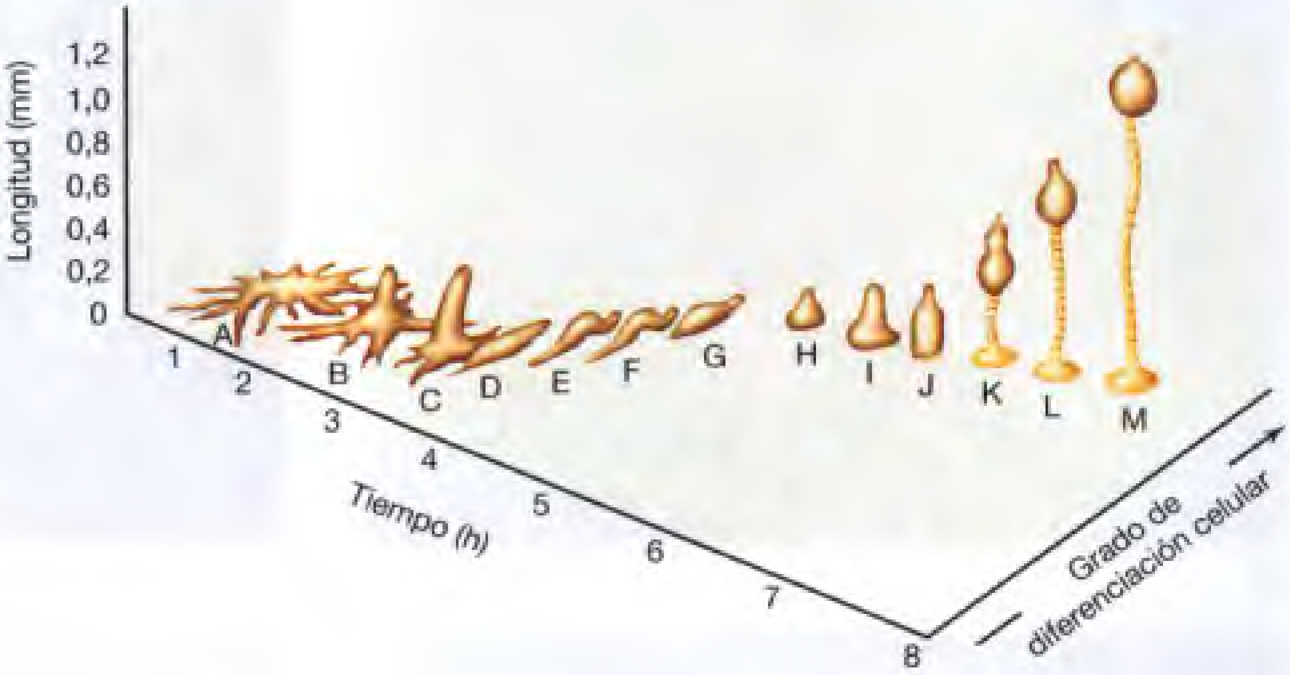


Figura 14.25 Estadios de diferenciación del cuerpo fructificante en el hongo mucoso *Dictyostelium discoideum*. (A-C) agregación de las amebas; (D-G) migración del cuerpo formado por las amebas; (H-L) Culminación y formación del cuerpo fructificante; (M) Cuerpo fructífero maduro. El cuerpo fructificante contiene esporas capaces de regenerar las células vegetativas y empezar de nuevo el ciclo vital.

dúnculo y las de la parte trasera en esporas. Las células que se diferencian en pedúnculo comienzan a producir celulosa, que da rigidez al sistema. En la maduración de la cabeza, las esporas se liberan y se dispersan. Cada espora germina y regenera una ameba.

El ciclo del cuerpo fructificante y formación de esporas de *Dictyostelium* es un proceso *asexual*. Sin embargo, se pueden producir también esporas sexuales o *macrocistos*. Los macrocistos se forman de agregados de amebas que quedan encerrados en una pared celulósica. Siguiendo la conjugación de dos amebas, se desarrolla una más grande que procede a fagocitar al resto de las amebas. En este punto, se forma una gruesa pared celulósica alrededor de la ameba gigante originando así el macrocisto que puede permanecer durmiente durante largos periodos de tiempo. Eventualmente, el núcleo diploide sufre meiosis para formar núcleos haploides, que se integran en las nuevas amebas que, una vez más, inician el crecimiento vegetativo (Figura 14.24).

✓ 14.10 Revisión de conceptos

Los hongos mucosos acelulares son masas amorfas protoplásmicas, mientras que los celulares son masas de células individuales que se agregan para formar cuerpos fructíferos y esporas.

- ✓ ¿En qué se parecen los hongos mucosos a los hongos y en qué a los *protozoos*?
- ✓ ¿Qué es un *macrocisto*?

14.11 Algas

Géneros clave

Chlamydomonas
Euglena
Gonyaulax

Las algas constituyen un grupo diverso de organismos eucarióticos que contienen *clorofila* y llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica (*véase* Sección 17.5 y Figuras 14.26 y 14.27). No deben confundirse con las cianobacterias, que también producen oxígeno en la fotosíntesis pero que son *Bacteria* y, por tanto, evolutivamente muy diferentes de las algas (Sección 12.26). Aunque la mayoría de las algas son de tamaño microscópico y, por tanto, son microorganismos, algunas son macroscópicas, e incluso, pueden llegar a medir 30 m de longitud como ocurre con las laminarias.

Diversidad algal

Las algas son o bien unicelulares (Figura 14.26*a* y *c*) o coloniales; las últimas forman agregados (Figura 14.26*b*), mientras que si las células están agregadas extremo con extremo se dice que son filamentosas (Figura 14.26*d*) Entre las formas filamentosas aparecen filamentos sin ramificaciones y filamentos con una intricada ramificación. Contienen clorofila y, por ello, la mayoría son de color verde. Sin embargo, algunas aparecen de color marrón o rojo debido a la presencia de xantofilas que enmascaran el color verde. Las algas contienen uno o más **cloroplastos** que, como se sabe, encierran los pigmentos fotosintéticos (*véase* Sección 14.3). A menudo, los cloroplastos pueden ser reconocidos con la ayuda del microscopio dentro del citoplasma, precisamente por poseer color verde (Figura 14.26). Las características generales estructurales de los cloroplastos se recogen en la Sección 14.3 y su filogenia en las Secciones 12.27 y 14.4.

El examen de la Figura 14.11 muestra que las algas constituyen un grupo filogenético heterogéneo. Aunque las algas verdes (Chlorophyta, Tabla 14.3) y en menor medida las rojas (Rhodophyta, Tabla 14.3) están bastante relacionadas con las plantas verdes. Otros grupos como es el de las diatomeas o las pardas constituyen linajes antiguos dentro de las algas (Figura 14.11). Las euglenas (Figura 14.27*a*) están incluso menos derivadas y, como se ha indicado antes, están relacionadas con los protozoos flagelados. De hecho, las células de *Euglena* pueden perder espontáneamente su cloroplasto y existir estrictamente como un quimioorganotrofo (*véase* Sección 14.8). Las algas rojas (Figura 14.27*b*) son interesantes en el sentido de que sus cloroplastos contienen *ficobilitroteínas*, el principal pigmento de cianobacterias (*véase* Sección 17.3). No es por tanto de extrañar que el cloroplas-

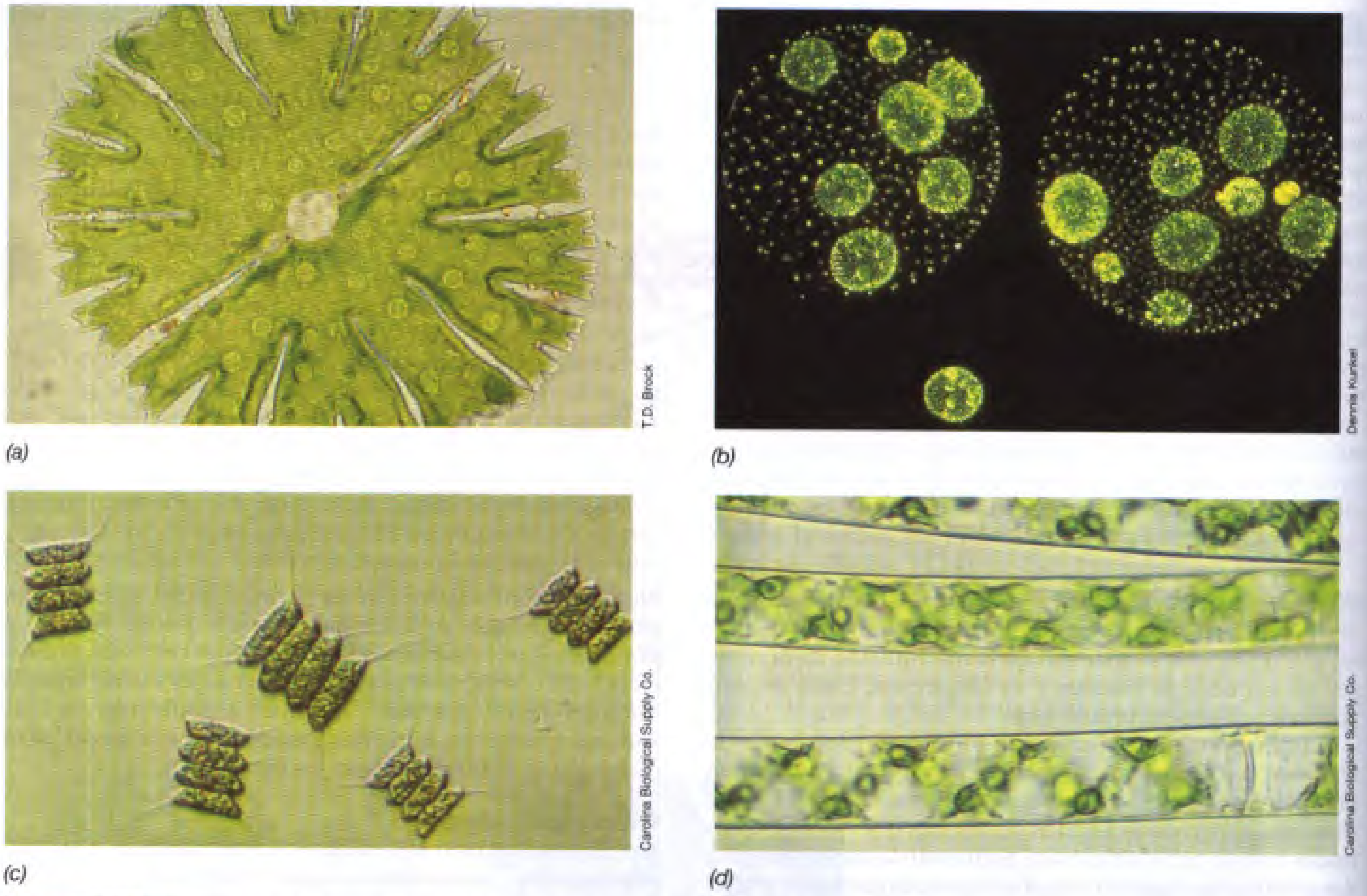
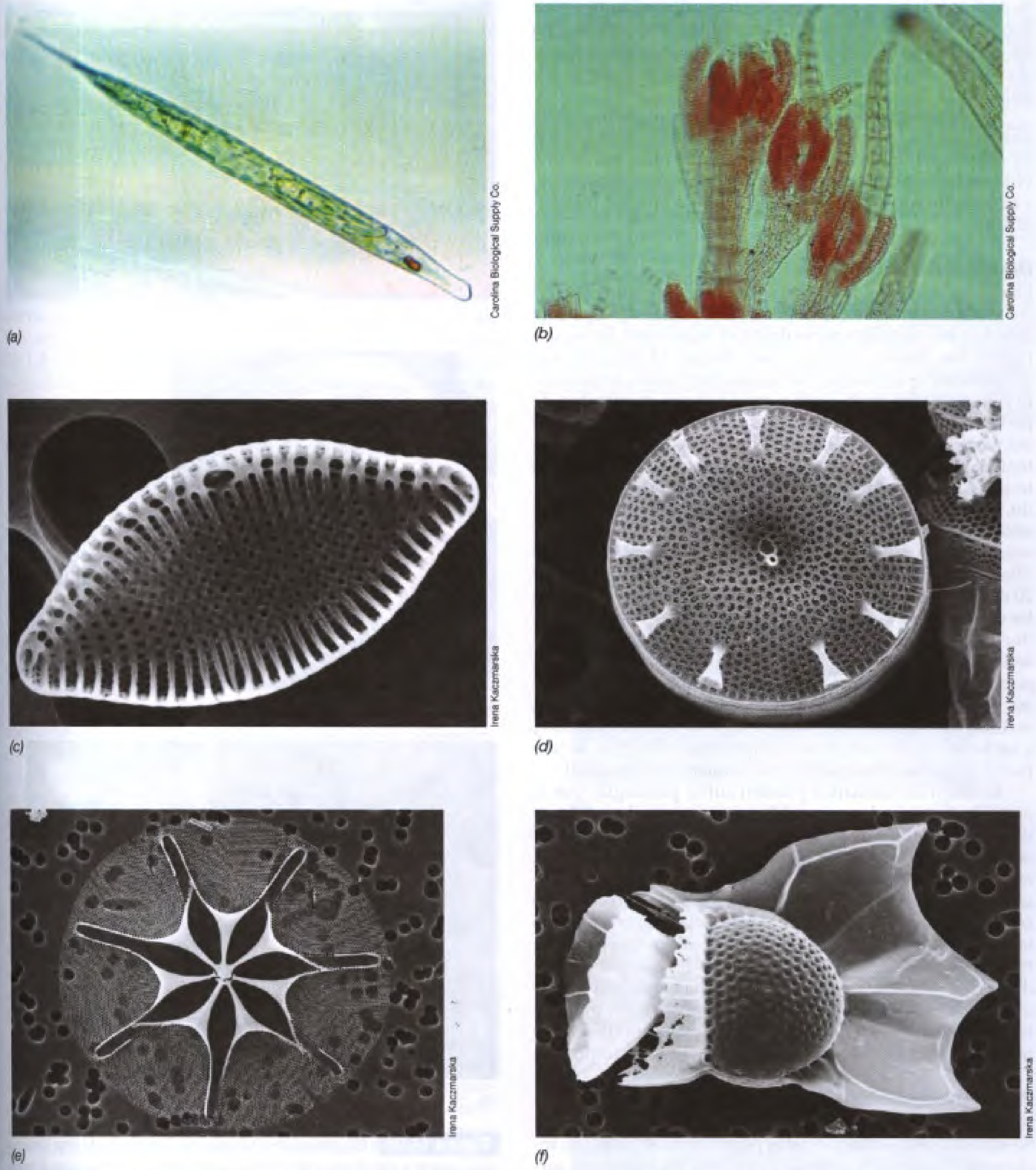

(a)
T.D. Brock
(b)
Dennis Kunkel
(c)
Carolina Biological Supply Co.
(d)
Carolina Biological Supply Co.

Figura 14.26 Micrografías de algas verdes representativas. (a) *Micrasterias*. Célula aislada. (b) Colonia de *Volvox* con un gran número de células. (c) *Scenedesmus*. Paquetes de cuatro células. (d) *Spirogyra*. Nótese el cloroplasto en forma de espiral.

TABLA 14.3 Propiedades de los principales grupos de algas

Grupo	Nombre	Morfología	Pigmentos	Representante típico	Material de reserva	Pared celular	Hábitat
Chlorophyta	Algas verdes	Unicelular con ramificaciones	Clorofilas *a* y *b*	*Chlamydomonas*	Almidón; (α-1,4-glucano), sacarosa	Celulosa	Agua dulce, suelos
Euglenophyta[a]	Euglenoides	Unicelular flagelados	Clorofilas *a* y *b*	*Euglena*	Paramilón (β-1,2-glucano)	No	Agua dulce
Dinoflagellata	Dinoflagelados	Unicelular flagelados	Clorofilas *a* y *c*,	*Gonyaulax* *Pfiesteria*	Almidón (α-1,4-glucano)	Celulosa	Marinas
Chrysophyta	Diatomeas, algas pardas	Unicelular	Clorofilas *a* y *c*	*Nitzschia*	Lípidos	Dos componentes superpuestos de sílice	Agua dulce, marinas, suelos
Phaeophyta	Algas pardas	Filamentosas con ramificaciones grandes y parecidas a las plantas	Clorofilas *a* y *c*, xantofilas	*Laminaria*	Laminarina (β-1,3-glucano), matrinol	Celulosa	Marinas
Rhodophyta	Algas rojas	Unicelular, filamentosas con ramificaciones	Clorofilas *a* y *d*, ficocianina, ficoeritrina	*Polysiphonia*	Floridean starch (α-1,4- and α-1,6-glucan)	Celulosa	Marinas

[a] Este grupo también se considera en los protozoos (*véase* Sección 14.8).



(a) Carolina Biological Supply Co.

(b) Carolina Biological Supply Co.

(c) Irena Kaczmarska

(d) Irena Kaczmarska

(e) Irena Kaczmarska

(f) Irena Kaczmarska

Figura 14.27 Algas no pertenecientes a Chlorophyta. (a-b) Micrografías de campo claro. (a) *Euglena*, un miembro de Euglenophyta. (b) *Polysiphonia*, un alga roja marina (Rhodophyta) que crece fija a la superficie de plantas marinas. (c-f) Micrografías de barrido. (c) Frústula de la diatomea marina *Nizschia* mostrando simetría pinada. (d) Frústula de la diatomea marina *Thalassiosira* mostrando simetría radial. (e) Frústula de la diatomea marina *Asteriolampra* mostrando simetría radial. (f) Dinoflagelado *Omithocercus magnificus*. La célula propiamente dicha corresponde a la parte central globulosa; las estructuras de ornamentación se denominan *listas*.

to de las algas rojas, por supuesto un endosimbionte (*véase* Sección 14.4), muestre fuertes afinidades filogenéticas con las cianobacterias (*véase* Sección 12.25); su hospedador, por el contrario, forma un linaje distinto dentro de *Eukarya* (Figura 14.11).

Los dinoflagelados son algas marinas filogenéticamente muy relacionados con los protozoos ciliados. Algunos son de vida libre (Figura 14.27*f*), mientras que otros llevan una vida simbiótica con animales coralinos proporcionándoles, a cambio de cobijo, carbono fijado por su aparato fotosintético.

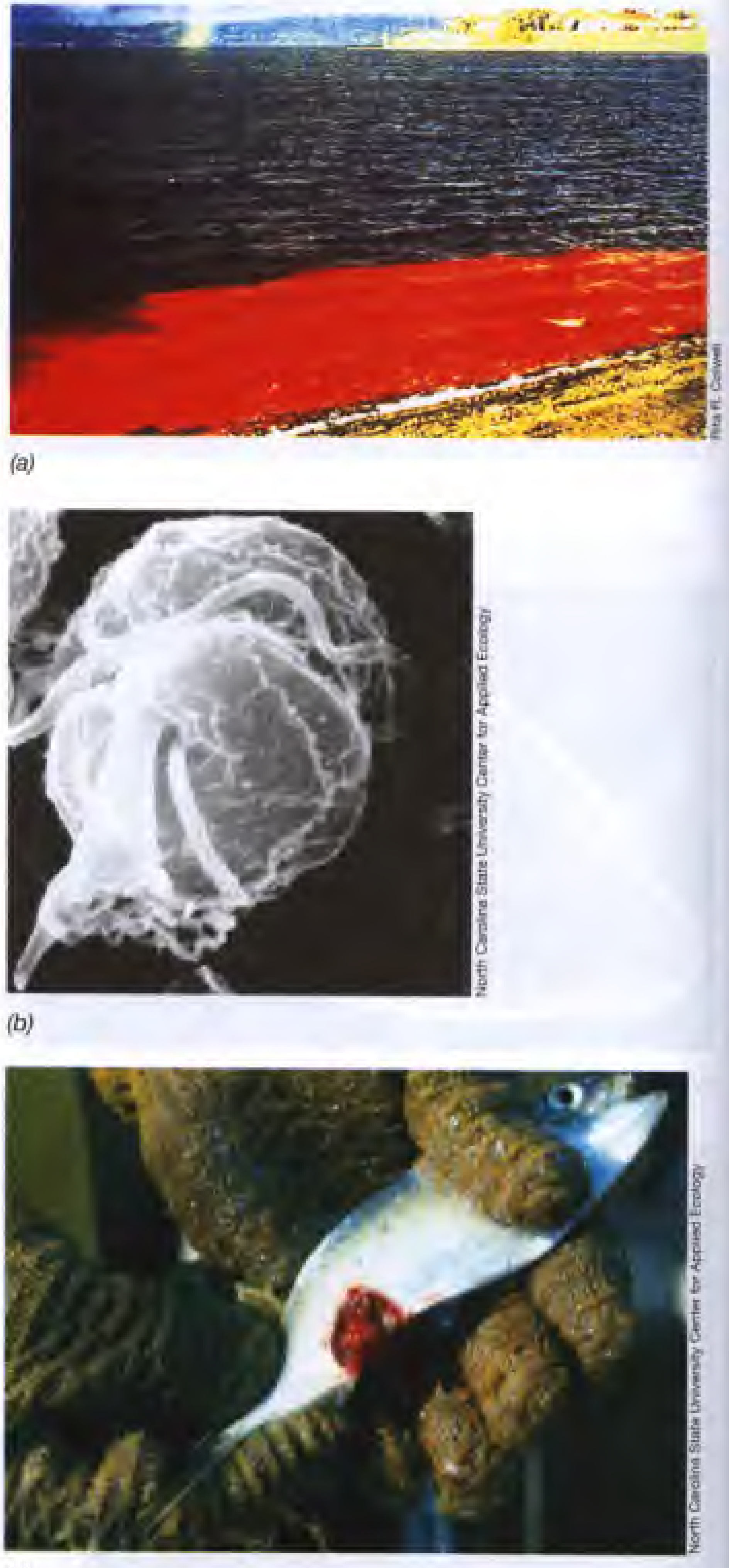
Dinoflagelados tóxicos

Los dinoflagelados tales como *Gonyaulax* (Figura 14.27*c*) crece ocasionalmente en suspensiones densas de color rojo debido a las xantofilas presentes en el organismo. Éstas configuran las clásicas «mareas rojas» (Figura 14.28*a*) que ocasionalmente se desarrollan en aguas templadas, usualmente contaminadas de la costa y asociada con mortandad de peces e intoxicación humana después de comer alimentos del mar contaminados. La intoxicación es debida a una potente neurotoxina paralizante y destructora de la piel. Las lesiones originan áreas del pez donde la piel ha degenerado, e incluso, se ha perdido por completo, permitiendo el desarrollo de bacterias oportunistas (Figura 14.28*c*). Los peces muertos por *P. piscicida* sirven de alimento al ameboideo *Pfiesteria*, que en sí mismo es un saprofito. Se conocen más de 20 diferentes estados en el ciclo biológico de *Pfiesteria*, uno de los cuales que es la espora tóxica, parece que es capaz de producir la enfermedad. Parece que de alguna manera la presencia del pez dispara la formación de la espora tóxica. *P. piscicida* puede producir grandes mortandades de peces y así, por ejemplo, causó la muerte de mil millones de peces en un brote en el estuario de Nuese (Carolina del Norte) en 1991 y otras que ha habido en la costa Atlántica de USA, se sospecha que ha sido producida por la misma enfermedad.

También los humanos pueden sufrir patologías por *P. piscicida*. Éstas incluyen problemas respiratorios, dolores de cabeza, dolores de las articulaciones y musculares, desorientación y pérdida de memoria. Como se indicó antes, en otras intoxicaciones por dinoflagelados (tales como *Gonyaulax*), la enfermedad se produce por entrar en contacto con aguas contaminadas o consumir marisco o moluscos también contaminados por el dinoflagelado. En el caso de *P. piscicida* produce una neurotoxina volátil que puede producir intoxicación, incluso cuando no ha existido contacto directo con los objetos contaminados. *Pfisteria* es, por tanto, un alga muy interesante cuya ecología puede ligarse más a un ser patógeno de peces que como a un fototrofo.

Pigmentos, metabolismo energético y polímeros reversos

Se usan diversas características para clasificar las algas, incluyendo la naturaleza de las clorofilas, los polímeros carbonados que utilizan como reserva, la estructura de la pared celular y el tipo de movilidad. Todas las algas contienen clorofila *a*. Algunas, sin embargo, contienen trazas de otras clorofilas derivadas de ella. Esto es característico de grupos algales. La distribución de las clorofilas y de otros pigmentos fotosintéticos en algas se resume en la Tabla 14.3.



Rita R. Colwell

North Carolina State University Center for Applied Ecology

North Carolina State University Center for Applied Ecology

Figura 14.28 Dinoflagelados tóxicos. (a) Fotografía de una «marea roja» causada por el crecimiento masivo de dinoflagelados tóxicos tales como *Gonyaulax*. La toxina es excretada en el agua y también se acumula en los moluscos que consumen los dinoflagelados. La toxina no tiene efecto para los moluscos pero es venenosa para peces y humanos. (b-c) *Pfiesteria* tóxica. (b) Micrografía de barrido de una espora de *P. Piscicida*. (c) Pez muerto por acción de *P. Piscicida*. Nótese las lesiones que afectan a la masa muscular del animal.

Todas llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica utilizando el agua como donador de electrones (Sección 17.5). Muchas son fototrofas obligadas y, por tanto, son incapaces de crecer en la oscuridad con sustratos carbonados orgánicos. Sin embargo, algunas especies pueden hacerlo y catabolizar azúcares sencillos y ácidos orgánicos en la oscuridad. Uno de los más comunes es el acetato, que puede ser usado como única fuente de carbono y energía por muchos flagelados y clorofitas. Además, algunas algas pueden asimilar compuestos orgánicos simples en presencia de luz (fotoheterotrofia; Secciones 17.1 y 17.4) pero no pueden utilizarlos como fuente de energía.

Una de las características clave utilizadas para la clasificación de algas, es la naturaleza de los **polímeros de reserva** que se sintetizan como resultado de la fotosíntesis. Las algas de la división Chlorophyta producen almidón (α-1,4-D-glucosa) de estructura semejante a la de plantas superiores. Por el contrario, las algas de otros grupos producen sustancias muy diversas (*véase* Tabla 14.3)

Las paredes celulares de las algas

Las algas muestran una considerable variación en cuanto a la estructura y química de sus paredes celulares. En muchos casos la pared celular está compuesta de fibras de celulosa, pero está usualmente modificada por la adición de otros polisacáridos tales como xilano, pectina, mananos, ácidos algínicos o ácido fucínico. En algunas algas, la pared está fortalecida por deposición de carbonato cálcico, estas formas, a menudo, se las conoce como «calcáreas» o «coralinas». Otras veces, es la quitina (a polymer y *N*-acetilglucosamina, *véase* Figura 3.5) la responsable de dar rigidez. Los euglenoides carecen de pared celular.

En las diatomeas (Figura 14.27 *c-e*), la pared celular está formada de *silicio* al que se añaden proteínas y polisacáridos. Incluso después de la muerte se mantienen intactos estos caparazones o *frústulas*. Permanecen intactos durante largos periodos de tiempo y constituyen una excelente fuente de fósiles. Así se sabe que las diatomeas aparecieron hace unos 200 millones de años. Las diatomeas muestran simetría en sus frústulas; pueden ser pinnadas (Figura 14.27 *c*) o radiales (Figura 14.27*d*, *e*).

Las paredes celulares de las algas contienen poros de 3-5 nm que permiten el peso de sustancias de bajo peso molecular, tales como agua, iones inorgánicos, gases y nutrientes necesarios para el metabolismo. Por ello, la fagocitosis es imposible y, en este sentido, las algas difieren de los protozoos y hongos mucosos.

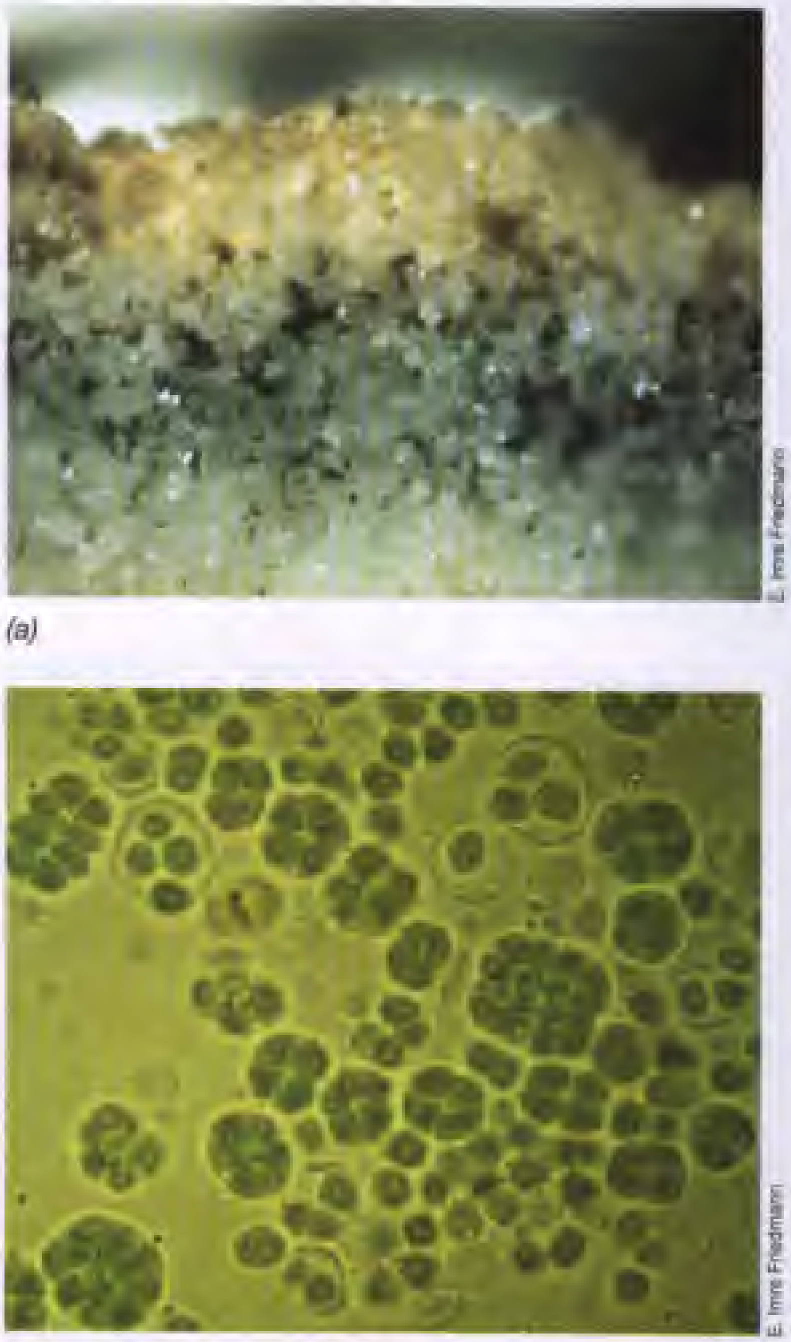
Movilidad y ecología de las algas

Muchas algas son móviles mediante flagelos, sin embargo, carecen de cilios. Formas simples, flageladas, como *Euglena* (*véase* Figura 14.27a) tienen un flagelo polar, mientras que los miembros típicos de las clorofilas tienen de dos a cuatro, también polares. Los dinoflagelados (Figura 14.27*f*) tienen dos flagelos de diferente longitud y con diferentes puntos de inserción en la célula. El flagelo lateral está insertado lateralmente, mientras que el longitudinal se origina de un surco lateral. En otros casos, las algas son inmóviles en su fase vegetativa pero forman gametos móviles durante la reproducción sexual.

Las algas abundan en hábitat acuáticos tanto dulces como salados. También se encuentran en hábitat artificiales como peceras o piscinas. También son comunes en el suelo; algunas especies sobreviven en medios secos (Sección 6.12) así como en hábitat acídicos. Por debajo de pHs 4-5, las cianobacterias no pueden crecer; de modo que ciertas algas son los únicos microorganismos fotosintéticos oxigénicos.

Comunidades algales endolíticas

Algunas algas son capaces de crecer dentro de las rocas porosas, como son las que contienen cuarzo (Figura 14.29*a*) y suelen encontrarse en capas cerca de la superficie de la roca. Las comunidades endolíticas fototróficas son comunes en lugares secos como son los desiertos o muy fríos como en el Antártico (Figura 14.29*a*). Por ejemplo, en los valles secos antárticos donde la temperatura y humedad son extremadamente bajas, la vida dentro de una roca puede tener grandes ventajas. Se calientan con el sol y el agua se va infiltrando en ellas. Las algas utilizarán esta agua


E. Imre Friedmann

(a)

E. Imre Friedmann

(b)

Figura 14.29 Cianobacterias endolíticas. (a) Micrografía de una roca de Makhtesh Gadol, Desierto de Negev (Israel) mostrando una capa de células de *Chrococcoidiopsis* aisladas de una roca arenisca en el desierto de Negev.

como fuente de humedad cuando el exterior de la roca muestre temperaturas extremas.

Existe una gran variedad de microorganismos fototrópicos que pueden formar comunidades endolíticas, incluyendo las cianobacterias (Figura 14.29*b*) y varias algas verdes. Además de los fototrofos de vida libre, las algas verdes y cianobacterias coexisten con hongos como líquenes (Sección 19.20). El metabolismo de estas comunidades endolíticas favorecen el desarrollo de microgrietas por donde se infiltra más agua que, al congelarse y descongelarse, produce eventualmente su fractura.

✓ 14.11 Revisión de conceptos

Las algas son *Eukarya* fototrópicos que contienen pigmentos fotosintéticos dentro del cloroplasto.

- ✓ ¿En qué difieren las *algas* de las *cianobacterias*?
- ✓ ¿Qué es inusual de las algas rojas?
- ✓ ¿Cuál es el hábitat primario de las algas?

Preguntas de repaso

1. Indique al menos tres características de las células eucarióticas que claramente las diferencie de las procarióticas.
2. ¿En qué se parecen y diferencian estructutalmente las mitocondrias y los hidrogenosomas? ¿En qué difieren metabólicamente?
3. ¿Qué nos indica el hecho de que un antibiótico como la estreptomicina bloquee la síntesis proteica en orgánulos en relación con *Bacteria*?
4. ¿Cuáles son las diferencias químicas entre *microfilamentos* y *microtúbulos*? ¿Realmente están ausentes estas estructuras en los procariotas? (Revisar la Sección 6.1).
5. Compare y contraste los procesos de *mitosis* y *meiosis*. ¿Qué proceso es absolutamente necesario para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y por qué?
6. ¿Cómo se determina el tipo sexual en una levadura?
7. ¿Cuáles son los nombres comunes de alguno de los grupos mayoritarios de los protozoos?
8. Compare y contraste los protozoos con los hongos, indicando al menos dos formas que los separan. ¿Cuál de estos grupos se parece más a los hongos mucosos y por qué?
9. ¿Cuáles son las principales diferencias entre *Physarum* y *Dictyostelium*?
10. ¿Cuáles son algunas características poco habituales de los dinoflagelados?
11. Examine la Figura 14.29*a*. ¿Por qué está la zona de crecimiento muy cerca de la superficie de la roca? (*Pista:* piense en el *metabolismo* de una cianobacteria, es muy semejante al de una alga verde).

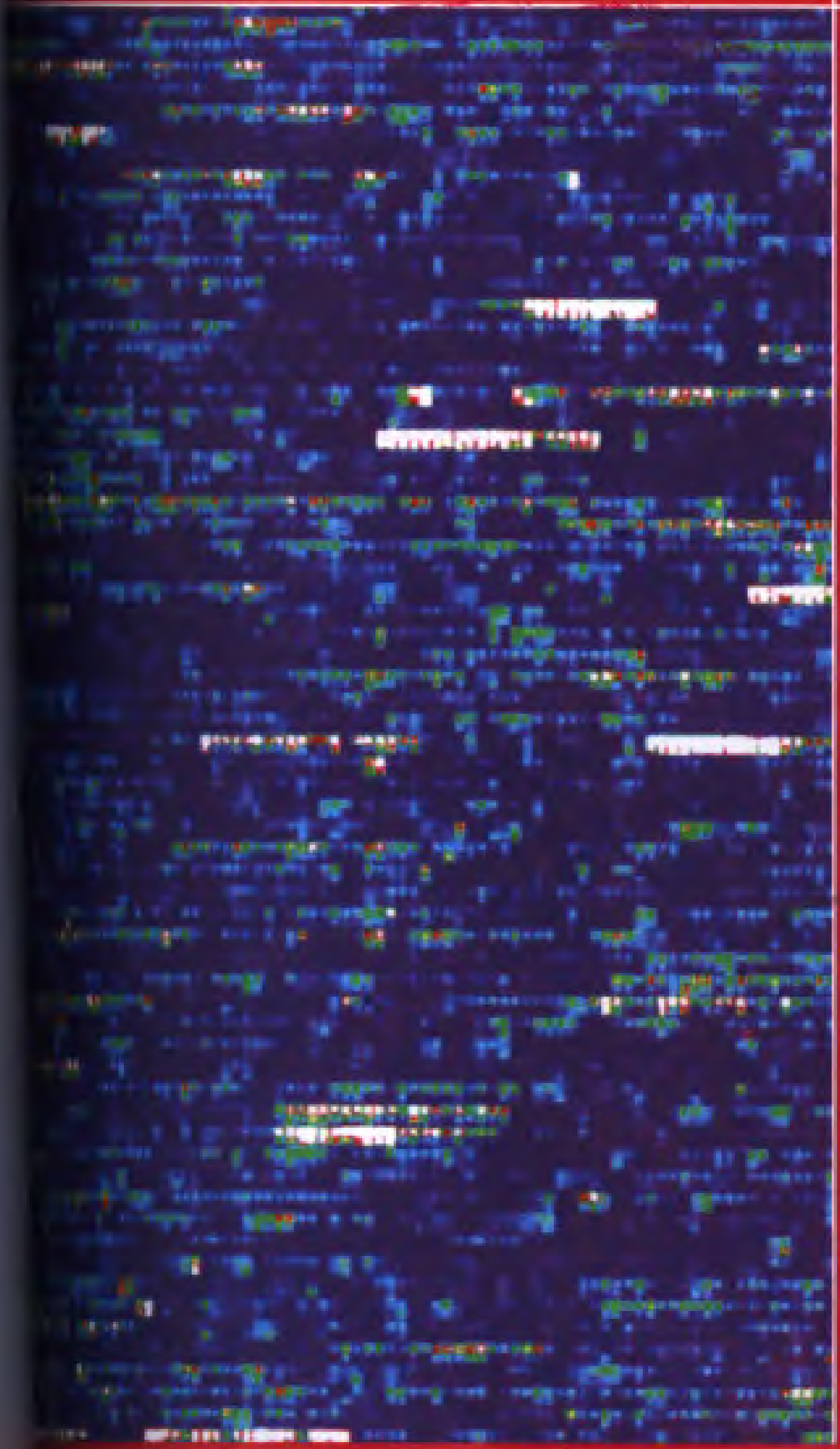
Ejercicios prácticos

1. Si los orgánulos como las mitocondrias y cloroplastos hubiesen sido originariamente células *eucarióticas*, ¿en qué diferirían las propiedades moleculares indicadas en la Sección 4.5?
2. En el capítulo siguiente aprenderá que los genomas de las células eucarióticas son, en general, mucho mayores que los de células procarióticas. Indique tres razones de por qué.

15

GENÓMICA MICROBIANA

El conocimiento de la secuencia del genoma completo de un organismo revela toda su dotación de genes, pero también nos dice cómo funciona el organismo así como su historia evolutiva. El conocimiento de las secuencias genómicas también facilita el estudio de la *expresión génica*. La aproximación tradicional para estudiar la expresión génica era centrarse en un gen o grupo de ellos relacionados entre sí. La ventaja del análisis genómico es que en un único experimento puede analizarse la expresión de todos los genes del organismo. Los chips de DNA, mostrados aquí, facilitan el análisis de la expresión génica al indicar rápidamente qué genes se transcriben en un momento determinado. Comparando los patrones de expresión génica es posible determinar en la célula qué proteínas se requieren para el crecimiento en unas condiciones determinadas.



I TÉCNICAS DE CLONACIÓN GENÓMICA 494
15.1 Vectores para la clonación genómica y secuenciación 494
15.2 Clonación y mapas genómicos 497

II GENOMAS MICROBIANOS 498
15.3 Genomas procarióticos 499
15.4 Evolución y familias génicas 502
15.5 Búsqueda y utilización de la información genómica 503
15.6 Genomas de microorganismos eucarióticos 504
15.7 Genomas de orgánulos 505

III FUNCIÓN GÉNICA Y REGULACIÓN 508
15.8 Proteómica 508
15.9 Micromatrices (*microarrays*) 509

Glosario

Bioinformática uso de computadoras para analizar, guardar y acceder a secuencias de DNA y proteínas

Cromosomas artificiales vectores de clonación que pueden llevar grandes insertos de DNA heterólogo y que permanecen en la célula como si fuese un cromosoma extra. Los más utilizados son los bacterianos (BAC) y los de levaduras (YAC).

Edición de RNA modificación del transcrito de RNA, diferente al procesado normal de RNA, para llegar a una molécula totalmente funcional

Familia génica genes relacionados por su secuencia con otros genes del mismo organismo

Genoma Todos los genes de una célula o virus

Genómica disciplina que implica el mapeo, secuenciación y análisis de genomas

In silicio uso de computadoras para llevar a cabo análisis sofisticados

Marco de lectura abierta (ORF) una secuencia de DNA que al ser transcrita origina una proteína de composición definida. Un marco funcional es el que codifica una proteína celular

Ortólogos genes que se encuentran en un organismo y que son similares a los de otro organismo pero que difieren por el propio proceso de especiación (véase también *Parálogos*)

Parálogos genes de un organismo cuya similaridad es el resultado de una duplicación génica en algún punto de la evolución del organismo (véase también *Ortólogos*)

Proteoma el conjunto de proteínas de una célula, tejido u organismo en un momento dado

Proteómica estudio global en el ámbito estructural y funcional de todas las proteínas de un organismo

Transferencia horizontal de genes presencia de un gen en un organismo procedente de otro

---

Como se indicó en el Capítulo 10, a partir de la segunda mitad de la década de los 40, los científicos han estado utilizando diversas técnicas genéticas para estudiar los genes microbianos. Estos estudios implican el mapeo de genes así como su función y regulación. A comienzo de los años 70 había aumentado significativamente las técnicas de manipulación *in vitro* del DNA (Secciones 10.12-10.18). Mientras que los científicos individualmente han estado centrados en el estudio de pequeñas regiones de los genomas, e incluso, genes aislados, la meta última es el entendimiento del organismo completo. El potencial de la clonación molecular y de las técnicas de secuenciación del DNA (*véanse* Secciones 10.13 y 10.14) creció tanto en las últimas décadas que se ha hecho posible la secuenciación de **genomas** completos de los organismos vivos (*véase* Sección 7.4). La palabra **genómica** se acuñó en la mitad de la década de los 80 para describir la disciplina del mapeo, secuenciación y análisis de los genomas.

El primer genoma secuenciado fue el RNA del virus MS2 de 3569 ribonucleótidos en 1976 (*véase* Sección 16.1). El primer genoma de DNA secuenciado fue el DNA monocatenario, de 5386 nucleótidos, del fago ϕX174 (Sección 16.2), en 1977, conseguido por el grupo liderado por Frederick Sanger (Sección 10.13). El primer genoma de una bacteria totalmente secuenciado fue el de *Haemophilus influenzae* con un tamaño de 1.830.137 pares de bases en 1995. Hacia la primavera del año 2000 se hizo público un borrador de la secuencia del genoma humano con unos 3000 millones de pares de bases.

No hubiese sido posible llevar a cabo esta ingente tarea sin el incremento en paralelo de la tecnología. Parte de esta mejora tecnológica fue la automatización de la secuenciación del DNA (Sección 10.13). Otro ha sido el desarrollo y uso de computadoras rápidas y fiables capaces de analizar grandes cantidades de información en lo que se denomina **bioinformática**. En este capítulo discutiremos algunos genomas microbianos así como algunas técnicas utilizadas para su análisis.

I TÉCNICAS DE CLONACIÓN GENÓMICA

La mayor parte de las técnicas en esta sección son modificaciones de las técnicas *in vitro* que se han analizado en el Capítulo 10. Los principios son los mismos, pero ahora el énfasis se pone en estudiar el genoma completo del organismo.

15.1 Vectores para la clonación genómica y secuenciación

Anteriormente, ya se han indicado algunos vectores plasmídicos y virales utilizados para la clonación molecular (Secciones 10.15 y 10.16). Aunque los vectores que se han indicado como el pBR322 y los Charon derivados de lambda se han utilizado profusamente para el clonado y secuenciación, incluyendo análisis genómico, se han desarrollado otros mucho más específicos con fines concretos. Éstos incluyen el bacteriófago M13 y los cromosomas artificiales de bacterias y levaduras (BAC y YAC).

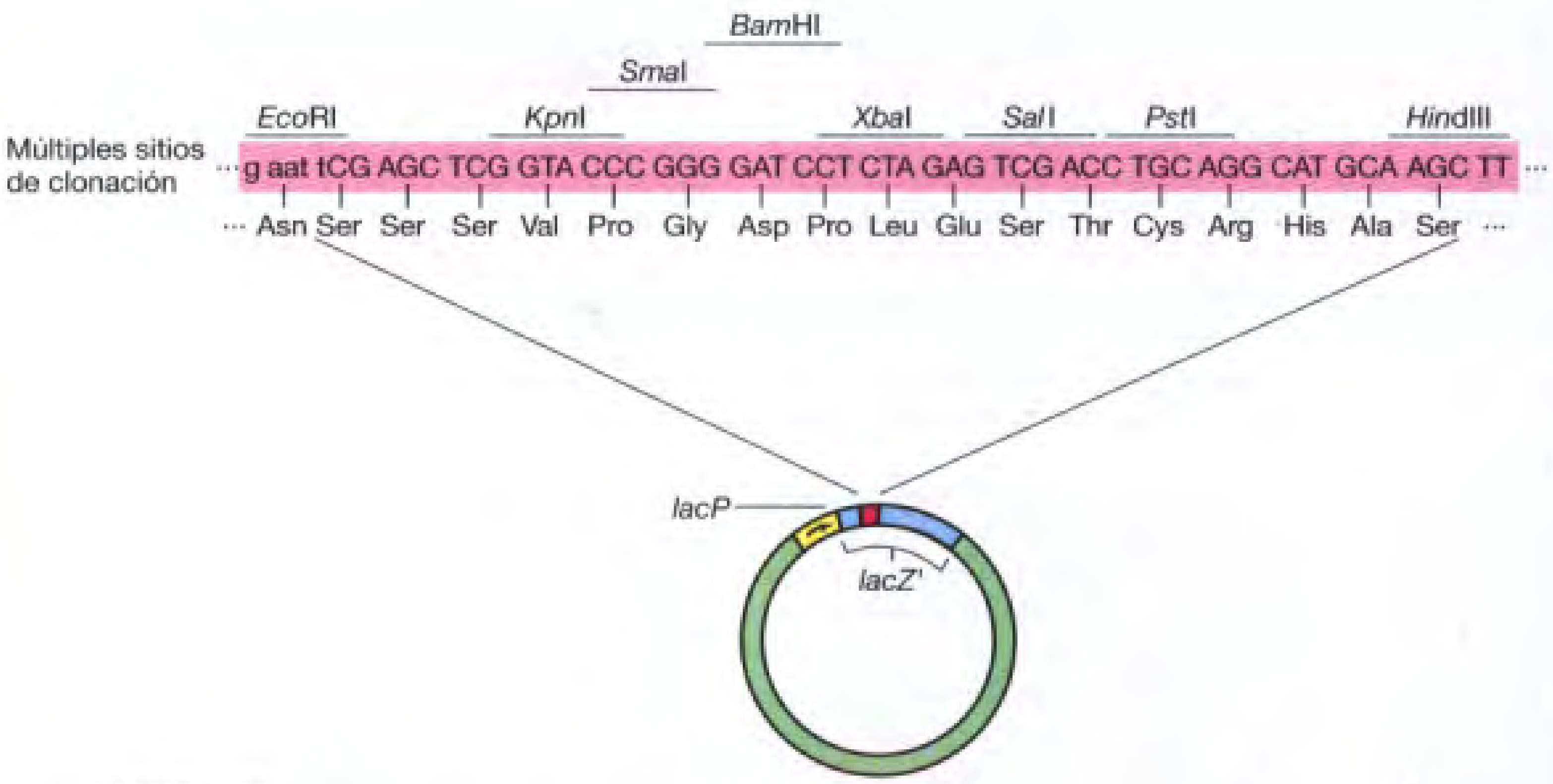
Vectores derivados del bacteriófago M13

M13 es un fago filamentoso con DNA monocatenario que replica sin matar a la bacteria (Sección 16.3). Los viriones se liberan por un proceso de gemación y es posible obtener cultivos infectados que proporcionan una fuente continua del DNA fágico. Una característica importante es la de ser monocatenario. En el procedimiento de Sanger para la secuencia del DNA (Sección 10.13) se necesita DNA monocatenario y, por esta razón, el DNA clonado en M13 proporciona una fuente idónea de este tipo de DNA. Por otra parte, el DNA monocatenario es muy útil como sonda para detectar otros ácidos nucleicos como es el caso del ensayo Southern (*véase* Sección 10.12).

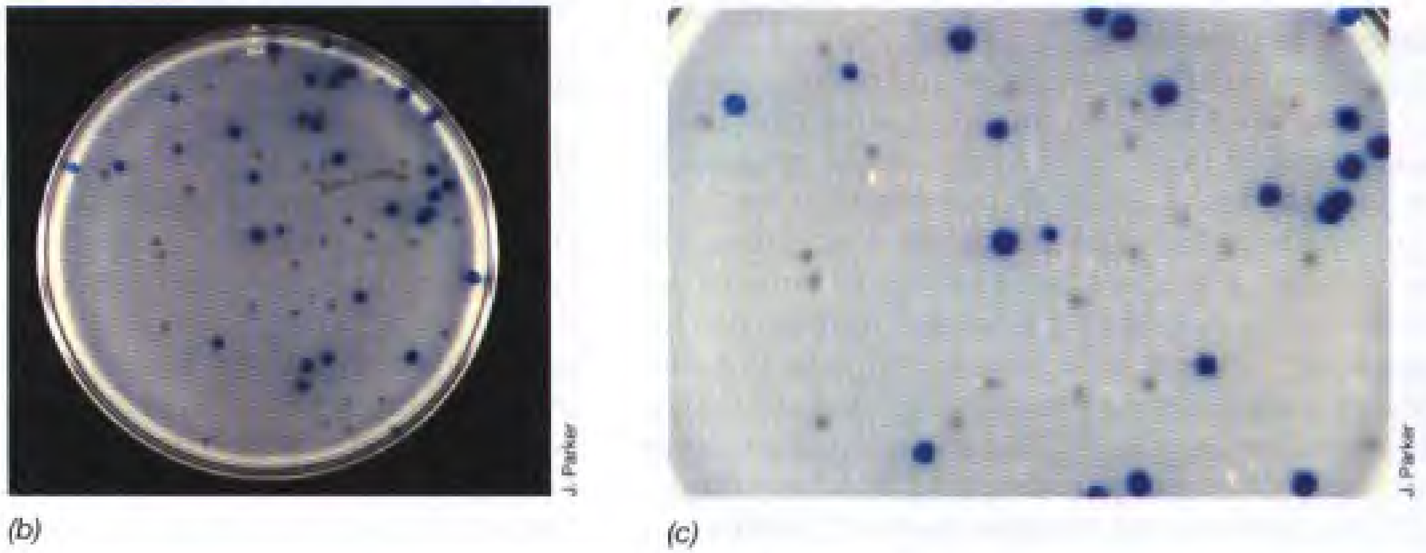
Sin embargo, para usar el M13 como vehículo de clonación se deben generar DNAs bicatenarios ya que las enzimas de restricción solamente funcionan sobre estos DNAs. Este DNA puede obtenerse de las células infectadas porque el M13 se replica como forma bicatenaria (Sección 16.3).

La mayor parte del genoma del M13 silvestre contiene información vital para su replicación. Sin embargo, existe una pequeña región llamada «secuencia intergénica» que puede ser utilizada como zona de clonación. Se pueden clonar en él hasta 5 Kbp sin afectar significativamente a la viabilidad del fago; a medida que aumenta el genoma, el fago se hace más largo. M13mp18 es un derivado de M13 en el que esta región intergénica se ha modificado para facilitar las labores de clonación. En la Figura 15.1*a*, se muestra tal vector.

Una modificación es la inserción de un fragmento funcional de *lacZ*, el gen de *E.coli* que codifica para la β-galactosidasa. Por tanto, las células infectadas con M13mp18 pueden detectarse fácilmente por su color en placas (Figura 15.1*b*). Este gen *lacZ* ha sido modificado con un pequeño fragmento del DNA de 54 pb denominado *múltiple sitio*


BamHI
SmaI
EcoRI
KpnI
XbaI
SalI
PstI
HindIII
Múltiples sitios de clonación
··· g aat tCG AGC TCG GTA CCC GGG GAT CCT CTA GAG TCG ACC TGC AGG CAT GCA AGC TT ···
··· Asn Ser Ser Ser Val Pro Gly Asp Pro Leu Glu Ser Thr Cys Arg His Ala Ser ···
lacP
lacZ'

(a) M13mp18


J. Parker

J. Parker

(b)

(c)

Figura 15.1 (a) Mapa parcial de M3mp18, un derivado de M13 construido para usarse como vector de clonación. El vector contiene el promotor *lac* y un gen, *lacZ'*, que codifica una β-galactosidasa funcional. Al comienzo del gen existe un punto múltiple de clonación que con varios puntos de restricción mantiene la fase de lectura. Se muestran los aminoácidos codificados por este fragmento (*polylinker*, en inglés). La mayoría de los fragmentos del DNA clonados en este lugar interrumpen el *lacZ'* y abolen la actividad β-galactosidasa. (b) Una placa con calvas de lisis originadas por el M13mp18 sobre bacterias sensibles sobre un medio que contiene 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido, denominado X-gal. Cuando la β-galactosidasa hidroliza el X-gal, libera el colorante azul insoluble. Muchas de estas calvas son azules, lo que indica la presencia de vectores sin DNA clonado. Muchas otras son incoloras, lo que indica que son recombinantes para el DNA foráneo insertado en el *lacZ'* que, por tanto, ha sido interrumpido. (c) Una ampliación de la figura anterior.

de clonación (en inglés *polylinker*). Este lugar contiene varios sitios de restricción únicos que pueden ser utilizados para el clonaje en M13. Este fragmento se inserta al principio de la secuencia codificante de *lacZ*. Además está en fase con un pequeño fragmento codificante para 18 aminoácidos que no afectan a la actividad de la enzima. Sin embargo, la inserción adicional del DNA en el lugar de clonación inactiva el gen y los fagos responsables originan calvas de lisis sin color, con lo que es muy sencillo el identificar los clones positivos (Figura 15.1*b* y *c*). Construcciones semejantes se han desarrollado con los fagos lamboides y plásmidos.

Uso de M13 en clonación molecular

Para clonar DNA en vectores M13, el DNA replicativo bicatenario se aisla del hospedador infectado y se trata con una enzima de restricción. El DNA foráneo, también bicatenario, se trata con la misma enzima de restricción. Después de ligarse se obtienen moléculas bicatenarias de M13 que contienen el DNA foráneo. Cuando estas moléculas se introducen en la célula por transformación, se replican y en su momento producen partículas maduras de bacteriófago que contienen moléculas de DNA monocatenario. En el fago maduro sólo se empaqueta una cadena de DNA. Cuál de las dos cadenas foráneas queda contenida en el fago maduro depende de la *orientación* en que se insertara la cadena. Como el DNA foráneo puede insertarse (en moléculas de fago separadas) en cualquier orientación, ambas cadenas pueden clonarse.

El DNA monocatenario de M13 recombinante puede ahora utilizarse para secuenciar todo el DNA. Como se conoce la secuencia de bases donde el DNA heterólogo se ha insertado, es posible utilizar oligonucleótidos sintéticos como primeros y complementarios a esta región y así determinar toda la secuencia del DNA recombinante insertado en dirección 3′. Los derivados de M13 han sido muy útiles para secuenciar incluso fragmentos largos de DNA tanto de genomas virales como procarióticos.

Cromosomas artificiales

Los vectores como el M13 o plásmidos que pueden mantener hasta 2 kb de DNA clonado son adecuados para hacer genotecas (Sección 10.14) o llevar a cabo tareas de secuenciación en procariotas. A veces se pueden usar vectores lambda que pueden albergar hasta 20 kb o más (Sección 10.16). Sin embargo, a medida que aumenta el tamaño del genoma para ser secuenciado así lo hará el número de clones necesarios para obtener la secuencia completa. Por ello, para realizar genotecas de microorganismos eucarióticos o eucariotas superiores es muy útil la utilización de vectores que porten segmentos muy grandes del DNA heterólogo. Estos vectores se denominan **cromosomas artificiales**.

En *Bacteria* existen con mucha frecuencia grandes plásmidos que replican muy establemente (Sección 7.4). Uno de estos plásmidos es el F de *Echerichia coli* (Sección 10.8). De él ocurren derivados naturales llamados plásmidos F′ que pueden portar grandes fragmentos del DNA (Sección 10.9). El plásmido F ha sido usado para construir vectores de estas características y que se denominan **cromosomas artificiales bacterianos (CAB; BAC en inglés)**. El BAC que se muestra en la Figura 15.2 es de 6,7 kb en lugar de los 99,2 kb del plásmido F. Solamente contiene algunos genes de F, incluyendo *oriS* y *repE* que son necesarios para la replicación y *sopA* y *sopB* que mantienen bajo el número de copias del plásmido (Sección 10.8). Insertado en el plásmido está el gen *cat* que confiere resistencia a cloranfenicol y un lugar de clonación con diversas dianas de restricción. En este tipo de plásmidos, se pueden insertar y mantener establemente hasta 300 kb. El hospedador normalmente es *E.coli* con los sistemas de restricción y modificación alterados (Sección 9.6). A menudo, la cepa es defectiva también en rutas de recombinación (Sección 10.5). Ello previene la recombinación y reordenamiento del DNA clonado.

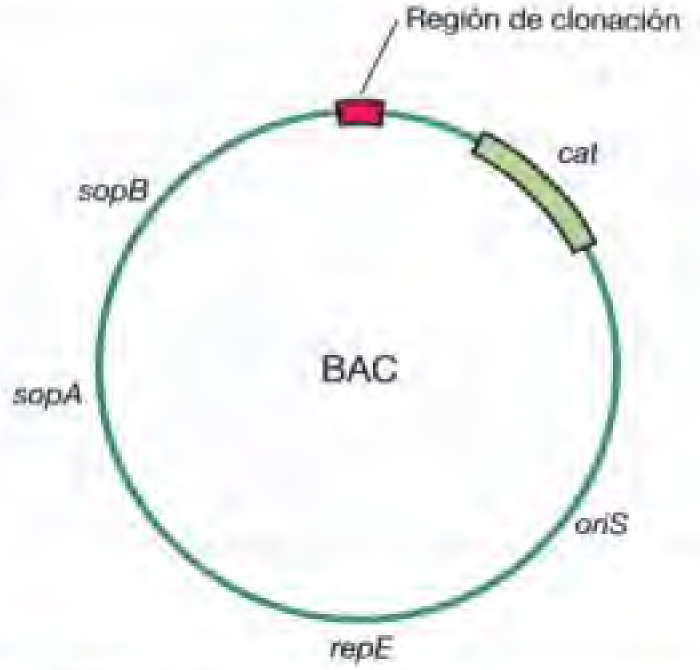


Figura 15.2 Mapa genético de un cromosoma artificial bacteriano. Los BACs derivan del plásmido F de *E. Coli*. El que se representa aquí es de 6.7 kb. En la parte superior del mapa está el punto de clonación que contiene varios puntos de restricción. El gen *cat* confiere resistencia a cloranfenicol. Los otros genes indicados están implicados en la replicación del plásmido. En el plásmido F original (99.2 kb) estos genes (Figura 10.17) están localizados en una región relativamete compacta. Por tanto, los BACs contienen solamente una pequeña fracción del plásmido de fertilidad.

El término **cromosoma artificial** no emergió con bacterias sino con el desarrollo de este tipo de vectores para levaduras: **cromosomas artificiales de levaduras (YAC en inglés)**. Estos vectores fueron diseñados para que se repliquen como cromosomas normales; contienen un *origen de replicación*, *telómeros* (Sección 7.7) y un *centrómero*, con lo que segregan como cromosomas nucleares normales durante la mitosis. También contienen un lugar de clonación y un gen o marcador de selección para después de la transformación. La Figura 15.3 muestra un diagrama de un vector YAC típico en el que se ha clonado un segmento del DNA heterólogo. Los vectores tipo YAC son en sí mismos de solamente 10 kb pero pueden aceptar DNA entre 200-800 kb. Después de identificar una región particular, ésta puede ser subclonada en un plásmido a fago para un análisis más detallado o estudio de secuencia. Aunque los YAC pueden albergar segmentos del DNA más grandes que los BAC, existen mayores problemas con su recombinación y reordenamiento del DNA clonado en levaduras que en *E.coli*; por ello, se utilizan más profusamente los BAC para este tipo de fines.

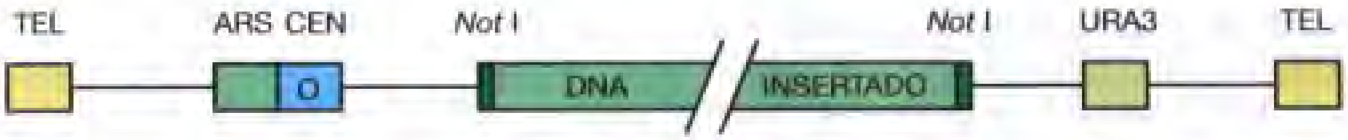


Figura 15.3 Diagrama de un cromosoma artificial de levaduras (YAC) con un fragmento foráneo de DNA. Este fragmento fue clonado en el sitio *Not*I. Los telómeros están marcados como TEL y el centrómero como CEN. El origen de replicación está marcado como ARS (Secuencia de Replicación Autónoma). El gen utilizado para la selección fue el URA3. La célula receptora tiene una mutación de modo que requiere uracilo para crecer (es Ura^-). Las células que contienen el YAC se hacen por tanto Ura^+. El dibujo no está a escala; el inserto de DNA sería normalmente de 200-800 kpb y el vector de 10 kpb.

✓ 15.1 *Revisión de conceptos*

Se han construido vectores de clonación muy útiles para la secuenciación de genomas completos. Algunos, como los derivados de M13, son útiles para secuenciar el DNA. Otros, como los llamados cromosomas artificiales, lo son para clonar grandes segmentos del DNA de cerca de una megabase.

- ✓ ¿Qué propiedad del M13 le hace útil para la secuenciación del DNA?
- ✓ El cromosoma artificial de levaduras (YAC) se comporta como un minicromosoma. ¿Qué es lo que lo hace posible?

15.2 Clonación y mapas genómicos

El análisis de un genoma comienza con la clonación molecular de fragmentos de su DNA (Sección 10.14) y la realización de su secuencia (Sección 10.13). Sin embargo, la metodología puede ser muy diferente cuando se trata de obtener la secuencia completa del genoma de un organismo dado y no simplemente de una pequeña región de DNA. Al igual que los métodos pueden diferir cuando el objetivo es la obtención de un producto génico específico.

Clonación directa del DNA bacteriano

Un método para secuenciar un genoma completo consiste en desarrollar una librería genómica ordenada de *fragmentos contiguos y solapados* denominados *contigs* y mapear físicamente estos clones utilizando endonucleasas de restricción (que también guían el proceso de clonación) y entonces secuenciar el DNA clonado. Para el juego original de clones se puede utilizar el fago. A partir de ellos se producirán subclones más pequeños en fagos como el M13 con los que se producirá la secuencia original. (Las reacciones típicas de secuencia dan alrededor de 500 nucleótidos mientras que puede empaquetar muchas kilobases de DNA clonado.) La construcción de mapas de restricción y el ordenado de clones en una librería genómica es muy laboriosa y lleva mucho tiempo. Sin embargo, una vez conseguido tal ordenamiento, la secuencia en sí misma es un proceso relativamente sencillo. Cuando se secuencia siguiendo el mapa es relativamente fácil determinar si hay saltos en la secuencia, y donde tiene que colocarse la secuencia de un determinado clon en el mapa cromosómico completo.

Otro método de secuenciación mucho menos ordenado ha sido posible con el advenimiento de los secuenciadores automáticos y programas informáticos muy poderosos y sofisticados (Sección 10.14). Se basa en clonar todo el genoma directamente y secuenciar aleatoriamente los clones. De esta forma, los clones se secuencian sin conocer el orden o la orientación del DNA clonado, o, incluso si se ha secuenciado ya la región. La secuencia resultante se analiza por computadora y es ésta la que busca las secuencias solapadas hasta construir la secuencia completa del organismo. Para asegurar que se obtienen todas las secuencias (esencialmente es un proceso estadístico) es importante secuenciar un elevado número de clones, muchos de los cuales serán idénticos o casi idénticos. Normalmente hay de 7 a 10 secuencias repetidas de una región dada del genoma. Al mismo tiempo, esto elimina el error de secuencia basado en una sola lectura.

Para utilizar esta modalidad de secuencia es necesario que la clonación en sí misma sea eficiente (uno necesita un elevado número de clones) y que el DNA a insertar sea realmente un proceso totalmente aleatorio. La distribución de los puntos de restricción no es aleatoria, pero digiriendo parcialmente con una enzima que reconozca secuencias cortas uno puede aproximarse a la digestión aleatoria. La ruptura mecánica genera fragmentos verdaderamente aleatorios.

Una de las razones por la que llevó tanto tiempo descubrir que el DNA era la base de la herencia en las células era porque las moléculas aisladas eran muy pequeñas y lo eran porque los enlaces fosfodiéster se rompen fácilmente por simple agitación mecánica u otras manipulaciones necesarias para su purificación. A partir de estas observaciones, se desarrollaron protocolos muy suaves para la recuperación del DNA de alto peso molecular. Ahora, sin embargo, los científicos se benefician de las fuerzas de cizalladura para generar fragmentos que se rompen al azar (es decir, sin especificidad de secuencia) haciendo pasar el DNA por un nebulizador. Se trata de un mecanismo con una pequeña abertura que reduce la solución a un aerosol y corta el DNA. Si es necesario, los fragmentos de DNA se pueden separar por tamaños mediante una electroforesis en gel, para después ser clonados en un vector y transformados en un huésped.

El procedimiento de aislar colonias puede automatizarse también haciendo más fácil el identificar y aislar aquellos clones recombinantes. Esto puede hacerse por *selección* si el vector contiene un marcador de resistencia a un antibiótico y el punto de clonación un gen que codifica para un producto letal a no ser que sea interrumpido por el DNA insertado (Sección 10.15). Nótese que el sistema *lacZ*, como en el caso de los vectores M13 (*véase* Figura 15.1) hace más fácil el escrutinio para plásmidos con insertos, pero no para su selección.

La secuenciación automática moderna puede leer simultáneamente un mismo fragmento (Figura 10.39). No obstante, a veces esta técnica deja vacíos de secuencia. Para cubrirlos se puede recurrir a reacciones de PCR (Sección

10.17) sobre DNA total para buscar los fragmentos que se obviaron en la primera secuencia.

Los científicos no están interesados en la secuencia en sí misma sino en los genes que contiene, en su función y, sobre todo, en su regulación. Por tanto, el siguiente paso en la consecución del genoma completo de cualquier organismo es la identificación de regiones funcionales, proceso que se denomina *anotación*.

Localización de posibles genes

Note el lector que la mayor parte de los genes de un organismo codifican proteínas y que en la mayoría de los genomas microbianos la mayor parte de ellos están formados de secuencias codificantes. Debido a que los microorganismos tienen pocos intrones (y los procariotas casi ninguno), los genomas microbianos normalmente consisten de una **secuencia interrumpida de marcos de lectura abierta** (en inglés ORF) (Sección 7.13). Un marco de éstos es aquel que codifica una proteína en la célula. Como se sabe, solamente algunas proteínas se han secuenciado de modo que después de la secuencia se deja a la computadora la labor de localización de los marcos de lectura abierta.

En la célula, los ribosomas toman conciencia de un marco de lectura abierta en un codón de iniciación (normalmente AUG, Sección 7.13). El ribosoma entonces traduce todo el mensaje hasta uno de los codones de terminación (Sección 7.13). La identificación funcional de los marcos de lectura abierta es un poco más complejo, ya que los codones de iniciación y/o terminación pueden presentarse distribuidos aleatoriamente y con una frecuencia razonable.

Una buena pista para resolver la funcionalidad de un determinado marco de lectura abierto es el tamaño. La mayoría de las proteínas contienen 100 o más aminoácidos de modo que la mayor parte de los marcos funcionales tienen más de 100 codones. Sin embargo, con esta filosofía en ciertos procariotas uno puede perder marcos funcionales muy relevantes. Debido a que la mayoría de los organismos muestran preferencia por determinados codones cuando existen codones sinónimos, el análisis de uso de codones puede también ayudar para el análisis funcional de los marcos de lectura abierta. Recuerde también el lector que los ribosomas procarióticos comienzan la traducción a cierta distancia (en dirección 5') de secuencias típicas de Shine-Dalgarno (Sección 7.15). Por ello, la búsqueda de estas secuencias puede ayudar a este análisis funcional de los marcos de lectura abierta. La Figura 15.4*a* muestra un marco de lectura abierta típico. La Figura 15.4*b* recoge una región de genoma funcional que contiene secuencias codificantes en ambas bandas del DNA. Por supuesto que algunos genes codifican para tRNAs y otros para rRNAs que no son reconocidos por los programas que solamente buscan marcos de lectura abierta; son, sin embargo, fácilmente reconocidos porque están altamente conservados en la evolución (Secciones 7.14 y 11.5-11.7).

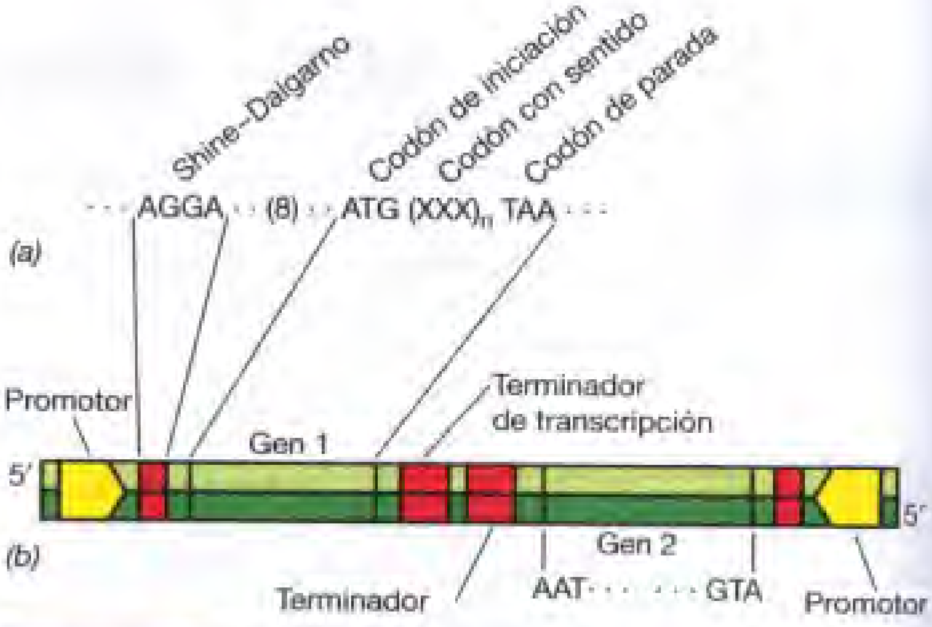


Figura 15.4 Localización de posibles marcos de lectura abierta funcionales. (a) La secuencia que se muestra desde una banda incluye un sitio potencial de Shine-Dalgarno (AGGA) separada de un codón de iniciación (ATG) por 8 bases. Las bases siguientes al codón de iniciación van seguidas de unos 100 codones con sentido y uno de parada UAA (es el más habitual). (b) La molécula de DNA con el marco descrito en (a) como Gen 1. Nótese que aguas arriba de este marco hay un promotor y aguas abajo un terminador de transcripción. También se incluye en el fragmento del DNA otro gen que tiene los mismos componentes pero que sería transcrito en sentido contrario. Las secuencias de Shine-Dalgarno, codones de iniciación, codones con sentido y codones de terminación funcionan solamente a nivel del RNA: aquí se muestran pares de bases que codifican estas secuencias funcionales.

Un marco de lectura abierta será probablemente funcional si su secuencia es similar a otros de función semejante en otros organismos, (con idependencia de que codifiquen proteínas o no) o si una parte del marco de lectura posee una secuencia conocida y que codifica un dominio proteico determinado. Sería prácticamente imposible llegar a conocer el genoma funcional de un procariota sencillo si no fuese por la inestimable ayuda de las computadoras y programas específicos. Tanto es así que se ha acuñado el termino *in silicio*, comparable a los más clásicos *in vivo* o *in vitro*. La Figura 15.5 muestra un mapa construido por computadora con la secuencia completa de *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis (Sección 26.5). En este caso, se indican los marcos de lectura abierta así como los genes que codifican tRNAs y rRNAs.

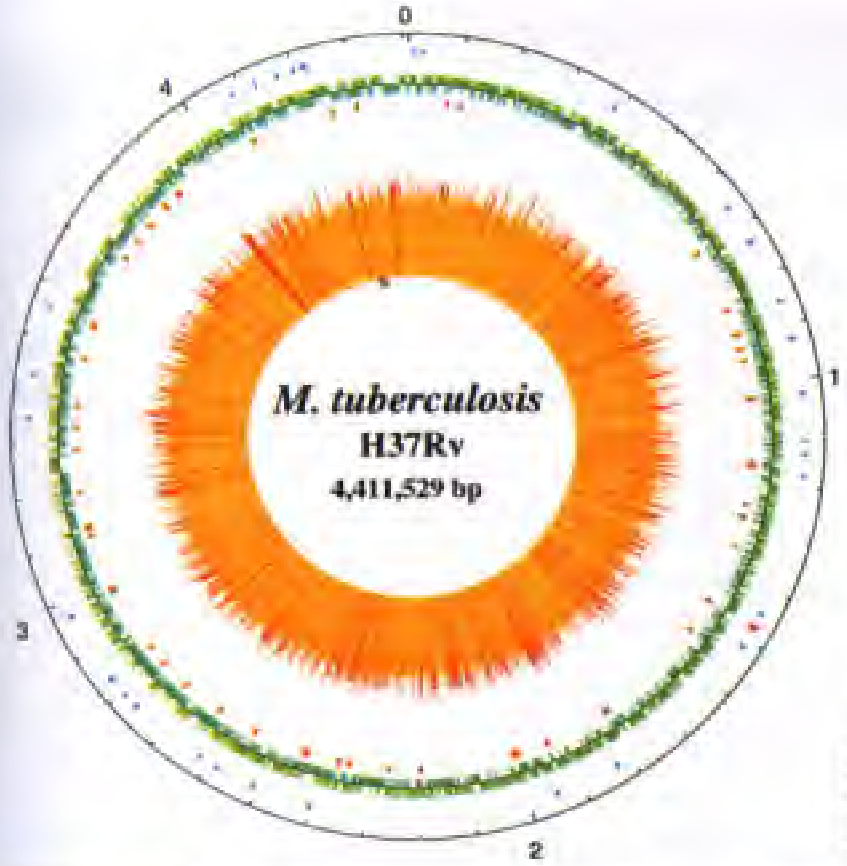
✓ 15.2 Revisión de conceptos

La clonación directa seguida de secuenciación aleatoria es un método utilizado para obtener la secuencia de genomas completos microbianos. Después de que dichas secuencias son ensambladas por computadora, se buscan los marcos de lectura abiertos funcionales así como los genes de tRNAs y rRNAs en un proceso conocido como anotación.

- ✓ Para el análisis genómico, no hay que secuenciar directamente a partir del DNA clonado en un fago l. ¿Por qué no?
- ✓ ¿Qué es un *marco de lectura abierto* (ORF)?

II GENOMAS MICROBIANOS

Ya han sido secuenciados muchos genomas microbianos, demasiados para ser tratados individualmente. En esta sección del capítulo nos centraremos en lo que nos indica el análisis de estos genomas.



Julian Parkhill

Figura 15.5 Mapa cromosómico de *Mycobacterium tuberculosis*. El círculo más externo muestra el tamaño del cromosoma en Mb con un cero en el punto de origen de replicación del DNA. Dentro de él hay un anillo en azul, los genes tRNA y un operón (naranja) rRNA. El círculo siguiente muestra los marcos de lectura transcritos en el sentido de las agujas del reloj (verde oscuro) y en sentido contrario a las agujas del reloj (verde claro). Debajo hay un círculo indicando la localización de algunos elementos repetitivos del DNA, incluyendo secuencias e inserción (naranja). El histograma del centro muestra contenido de GC por zonas. En amarillo, valores menores al 65% y en naranja, superiores a esta cifra. La figura se generó con el software DNASTAR y se publicó en *Nature* 393:537-544 (1998). © Macmillan Magazines Ltd. (*véanse* Secciones 12.23 y 26.5).

15.3 Genomas procarióticos

Se han completado más de 100 genomas procarióticos y muchos otros están siendo completados. La Tabla 15.1 recoge 20 de éstos, tanto de *Archaea* como de *Bacteria*. (Algunos procariotas con los genomas completamente secuenciados aparecen en la Tabla 7.2.) Esta lista no responde al azar como tampoco lo son los esfuerzos que están detrás de cualquiera de estos programas. Aunque la secuenciación de un genoma procariótico es cada día más fácil y rutinaria no deja de ser todavía un esfuerzo respetable y sin lugar a dudas existen importantes razones científicas y/o sociales para haber iniciado cualquiera de estos proyectos.

Nótese que en la lista de la Tabla 15.1 se incluyen 9 patógenos causantes de enfermedades en todo el Planeta. Los tres hipertermófilos pueden tener mucha importancia en Biotecnología pues sus enzimas son resistentes a la temperatura (Secciones 6.10, 10.17 y 13.11). De hecho, las necesidades de las industrias biomédicas y biotecnológicas han tenido y tienen importantes razones para generar interés en este tipo de proyectos. Sin embargo, la lista también incluye microorganismos como *Bacilus subtilis* y *Escherichia coli* que constituyen sistemas genéticos ampliamente estudiados y utilizados y *Caulobacter crescentus*, modelo de microorganismo con profunda diferenciación celular (Sección 12.16)

Tamaño de los genomas procarióticos

El análisis de los genomas nos permite contestar a más de una pregunta fundamental en Biología. Por ejemplo, el estudio de genomas pequeños como es el de *Micoplasma genitalium* y de *M. pneumoniae* muestra que los 470 marcos de lectura abierta del primero se encuentran en el segundo. Buscando genes similares en otros organismos y determinando cuáles no son esenciales por mutagénesis transposonal (Sección 10.11), los científicos han llegado a la cuasi-certeza de que son suficientes entre 265 y 350 genes codificantes de proteínas para mantener una célula. Quizá algún día encontraremos o construiremos un organismo con un genoma tan pequeño. Note el lector que *Methanococcus jannaschii* (Secciones 13.4 y 17.7) es un autótrofo y contiene solamente 1738 marcos de lectura abierta. Esto le permite no solamente ser de vida libre, sino conseguir absolutamente todos sus productos celulares a partir del CO_2 (Sección 13.4).

No es coincidencia que la Tabla 15.1 recoja varios genomas pequeños. Las estrategias para su secuencia son mucho más simples que las de genomas grandes, por lo que al principio hubo un claro sesgo hacia tales genomas. Nótese que el genoma de *M. genitalium* es más pequeño que el de virus de *Chlorella* (Sección 16.6) y el Bacteriófago G (*véase* Sección 9.2). Sin embargo, la eubacteria *Pseudomonas aeruginosa* tiene tantos marcos de lectura abierta como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*véase* Sección 15.6). La bacteria *Streptomyces coelicolor* cuyo cromosoma lineal tiene 8 Mb posee 7846 marcos de lectura abierta o lo que es lo mismo 1800 más que *S. cerevisiae*. Algunos genomas procarióticos muy grandes, como es el caso de *M. xanthus* (9,5 Mb), no están concluidos o no son accesibles públicamente. En resumen, los procariotas poseen gemonas que oscilan desde el tamaño de virus grandes hasta el de eucariotas inferiores.

Análisis genómico

Sin la bioinformática no sería posible analizar y comparar los genomas. Uno de los primeros pasos consiste en comparar la secuencia con la anteriormente encontrada para otros genomas. Esto nos ayuda a determinar la función génica y qué genes son indispensables para el organismo en cuestión. Uno podría imaginar que organismos como *Treponema pallidum* que son parásitos obligados (Sección 26.12) y podrían necesitar pocos genes de biosíntesis de aminoácidos ya que todos los que necesitan son aportados por el hospedador. De hecho esto es así en este protozoo, aunque sí posee genes capaces de degradar péptidos hasta sus aminoácidos constituyentes. Por el contrario, *E.coli* tiene 131 genes implicados en el metabolismo de los aminoácidos y *B. subtilis*, una bacteria del suelo, más de 200.

Análisis comparativos como éste son útiles para la búsqueda de genes que codifican proteínas que presumiblemente den de existir por las propiedades que tenga el organismo en cuestión. *Thermotoga maritima* es un hipertermófilo de sedimentos marinos calientes que es capaz de metabolizar una pléyade de diferentes azúcares. La Figura 15.6 representa algunas de las rutas bioquímicas y sis-

TABLA 15.1 Cromosomas procarióticos[a]

Organismo[b]	Tamaño (pb)[c]	*ORF*[d]	Comentarios
Mycoplasma genitalium (B)	580 070	470	Genoma celular más pequeño conocido (Sección 12.21)
Mycoplasma pneumoniae (B)	816 394	677	Causa neumonía (Sección 12.21)
Borrelia burgdorferi (B)	910 725	853	Espiroqueta con cromosoma linear[e]. Causa enfermedad de Lyme (Secciones 12.33 y 27.4)
Chlamydia trachomatis (B)	1 042 519	894	Parásito intracelular obligado, patógeno humano (Secciones 12.27 y 26.13)
Rickettsia prowazekii (B)	1 111 523	834	Parásito intracelular obligado. Causa el tifus exantemático (Secciones 12.13 y 27.3)
Treponema pallidum (B)	1 138 006	1041	Espiroqueta. Causa la sífilis (Secciones 12.33 y 26.12)
Methanocaldococcus jannaschii (A)	1 664 976	1738	Metanógeno (Sección 13.4)
Helicobacter pylori (B)	1 667 867	1590	Causa úlceras pépticas (Sección 26.10)
Pyrococcus horikoshii (A)	1 738 505	2061	Hipertermófilo (Sección 13.10)
Methanothermobacter thermoautotrophicus (A)	1 751 377	1855	Metanógeno (Sección 13.4)
Thermotoga maritima (B)	1 860 725	1877	Hipertermófilo (Sección 12.36)
Archaeoglobus fulgidus (A)	2 178 400	2436	Hipertermófilo (Sección 13.7)
Staphylococcus aureus (B)	2 814 816	2593	Agente importante en infecciones nosocomiales (Secciones 12.19 y 25.7)
Synechocystis sp. (B)	3 573 470	3168	Cianobacteria (Sección 12.25)
Caulobacter crescentus (B)	4 016 942	3767	Ciclo celular complejo (Sección 12.16)
Bacillus subtilis (B)	4 214 810	4100	Modelo genético de Gram positivos (Sección 12.20)
Mycobacterium tuberculosis (B)	4 411 529	3924	Causa tuberculosis (Secciones 12.23 y 26.5)
Escherichia coli (B)	4 639 221	4288	Modelo genético de Gram negativos (Sección 12.11)
Pseudomonas aeruginosa (B)	6 264 403	5570	Metabólicamente versátil. Oportunista (Sección 12.7)
Streptomyces coelicolor (B)	8 667 507	7846	Posee cromosoma lineal[e]. Productor de antibióticos (Sección 12.24)

[a] A veces se encuentra la palabra «genoma» usada para referirse al cromosoma procariótico. Mientras que en algunos casos esto puede ser correcto, recuerde el lector que genoma incluye todos los genes de un organismo, incluso los de virus y los de plásmidos. En algunos casos, estos elementos genéticos no se encuentran y en otros casos pueden ser muy pequeños y portar genes sin importancia para la biología del organismo. Sin embargo, esto no es siempre así. Por ejemplo, *Borrelia burgdorferi* contiene 17 elementos plasmídicos de 533 kpb (Tabla 7.2).

[b] Entre paréntesis, siguiendo el nombre latino, hay una A si se trata de una *Archaea* o una B si es una *Bacteria*.

[c] La información sobre estos u otros genomas pueden encontrarse en TIGR Microbial Database (*www.tigr.org/tdb/mdb/mdbcomplete.html*). Una página web mantenido pos el Instituto de investigación genómica (TIGR), Rockville, MD, un instituto sin ánimo de lucro.

[d] Marcos de lectura abierta (ORF). El propósito de indicarlos aquí es para predecir el número total de proteínas que un organismo dado pueda codificar. Por ello, la acotación reside en lo que se considera un marco de lectura abierta. Por supuesto, se incluyen los genes que codifican proteínas conocidas, así como aquellos que codifican proteínas de más de 100 residuos de aminoácidos. Los marcos más pequeños no se incluyen a no ser que posean similitud con un gen de otro organismo, o que el uso de codones es el típico del organismo que se esté estudiando.

[e] Todos los cromosomas de esta tabla son circulares excepto el de *Borrelia burgdorferi* y el de *Streptomyces coelicolor*.

temas de transporte de *T.maritima* que han sido deducidas del análisis de su genoma. Como podría esperarse su genoma es rico en genes implicados en el transporte, particularmente aquellos para carbohidratos y aminoácidos. Una gran parte de su genoma (7%) está también implicado en el metabolismo de azúcares simples y complejos. Todo ello sugiere que *T. Maritima* existe en un ambiente rico en materia orgánica.

En la Tabla 15.2, se recoge información sobre la división de genes y sus actividades en procariotas. Información semejante está disponible para aquellos organismos cuyos genomas se han secuenciado hasta el día de la fecha.

Aunque existen diferencias entre organismos, en la mayor parte de los casos el número de genes que han sido identificados ronda el 60% de todos los marcos de lectura abierta (uno de estos marcos, cuyo producto no se parece a ninguna proteína conocida, a menudo se la conoce como *URF* (del inglés *U*nidentified *R*eading *F*rame), pero no quiere decir que no codifique una proteína; por el contrario, refleja que todavía existen muchos aspectos desconocidos de los genomas procarióticos. La búsqueda en las bases de datos genómicos puede conducir a nuevos y excitantes descubrimientos (*véase* Sección 15.5). En *E. coli* ya se han asignado funciones a 2700 genes de los 4300 que tiene. Muchos de los esenciales para la biosíntesis de macromoléculas, y por tanto para el organismo, ya se conocen desde hace años. Por todo ello, a medida que se vayan asignando funciones a los URF se verá que la mayoría no son esenciales y concomitantemente el número de genes realmente indispensables para una eubacteria típica irá disminuyendo (Tabla 15.2).

El análisis genómico también puede arrojar luz sobre la ecología de un determinado organismo. Por ejemplo, *Helicobacter pylori* codifica proteínas que contienen el doble de aminoácidos básicos como arginina y lisina (Sección 3.6) que las proteínas de otras bacterias. Presumiblemente, esto ayuda a *H. pylori* a sobrevivir en el ambiente ácido del es-

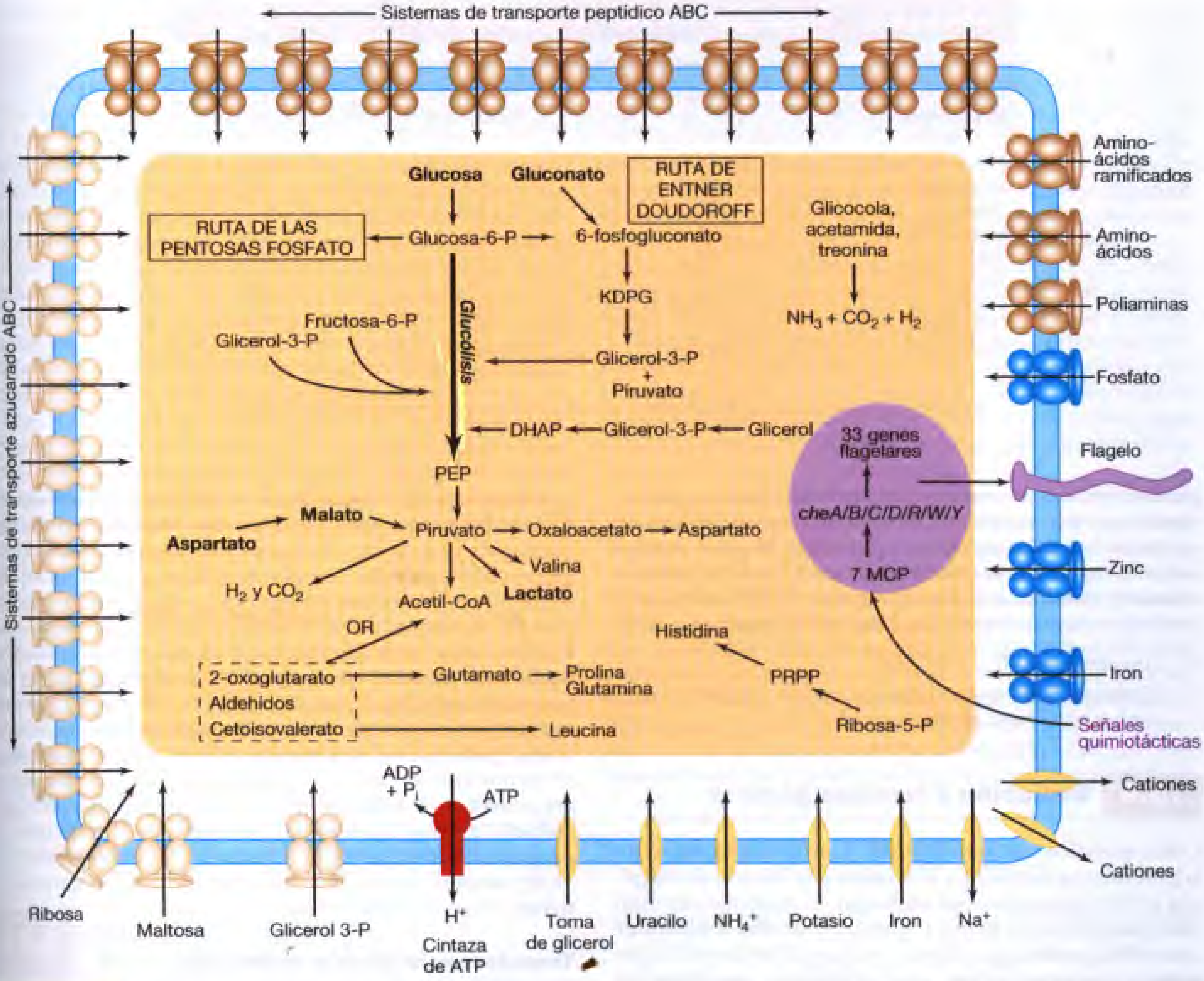

Sistemas de transporte peptídico ABC
Sistemas de transporte azucarado ABC
Glucosa
Gluconato
RUTA DE ENTNER DOUDOROFF
RUTA DE LAS PENTOSAS FOSFATO
Glucosa-6-P
6-fosfogluconato
KDPG
Glicocola, acetamida, treonina
$NH_3 + CO_2 + H_2$
Fructosa-6-P
Glicerol-3-P
Glucólisis
Glicerol-3-P + Piruvato
DHAP
Glicerol-3-P
Glicerol
PEP
Malato
Aspartato
Piruvato
Oxaloacetato
Aspartato
Valina
Lactato
H_2 y CO_2
Acetil-CoA
OR
2-oxoglutarato
Aldehidos
Cetoisovalerato
Glutamato
Prolina
Glutamina
Leucina
Histidina
PRPP
Ribosa-5-P
33 genes flagelares
cheA/B/C/D/R/W/Y
7 MCP
Amino-ácidos ramificados
Amino-ácidos
Poliaminas
Fosfato
Flagelo
Zinc
Iron
Señales quimiotácticas
Cationes
Cationes
ADP + P_i
ATP
Ribosa
Maltosa
Glicerol 3-P
H^+
Cintaza de ATP
Toma de glicerol
Uracilo
NH_4^+
Potasio
Iron
Na^+

Figura 15.6 Resumen de las rutas metabólicas y sistemas de transporte de *Thermotoga maritma*, un miembro de *Bacteria*. La figura muestra un plano de las capacidades metabólicas de este organismo. Éstas incluyen algunas de las rutas productoras de energía y el metabolismo de ciertos compuestos orgánicos así como las proteínas implicadas en el transporte, que fueron identificadas a partir del análisis genómico. No se recoge el nombre de los genes. El genoma contiene varios sitemas ABC de transporte (Sección 4.7). Hay 12 para carbohidratos, 14 para péptidos y aminoácidos, y otros para iones. Éstos se muestran como subunidades en la figura. Otras proteínas de transporte identificadas se indican como óvalos. Se muestra el flagelo y el organismo posee 7 transductores (MCP) y diversos genes de quimiotacticmo (*che*) (Sección 8.11) así como diversos implicados en su ensamblaje (Sección 4.10). Se muestran también algunos aspectos del metabolismo de los azúcares. Esta figura está adaptada del trabajo publicado por el Instituto de Investigación Genómica (TIGR).

tómago. Por otra parte, muchos de los genomas de patógenos primarios como por ejemplo *Borrelia burgdorferi*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Treponema pallidum* poseen familias génicas no relacionadas implicadas en la variación antigénica que protegen al organismo frente al sistema inmunológico de los vertebrados. En *B. burgdorferi* estos genes están localizados en los plásmidos. La información derivada del análisis genómico puede ser crítica para el diseño de nuevas estrategias que protejan al ser humano de los patógenos. La capacidad de comparar miles de genes ha dado como fruto un incremento muy acentuado del conocimiento del metabolismo de los organismos. Sin embargo, existen lógicamente todavía preguntas que han de ser contestadas en el futuro. Por ejemplo, no parece que haya reglas precisas que rijan el plegamiento de las proteínas que conduzcan a su termoestabilidad y que puedan deducirse del análisis genómico comparativo entre hipertermófilos y mesófilos.

✓ 15.3 Revisión de conceptos

Los genomas procarióticos secuenciados oscilan entre 0,58 y 8,7 Mb. El más pequeño es del tamaño de un virus grande y el más

TABLA 15.2 Función génica en genomas bacterianos

Categorías funcionales	Porcentaje de genes cromosomales[a] en esa categoría		
	Escherichia coli	*Haemophilus influenzae*	*Mycoplasma genitalium*
Metabolismo	21,0	19,0	14,6
Estructural	5,5	4,7	3,6
Transporte	10,0	7,0	7,3
Regulación	8,5	6,6	6,0
Traducción	4,5	8,0	21,6
Transcripción	1,3	1,5	2,6
Replicación	2,7	4,9	6,8
Otra conocida	8,5	5,2	5,8
Desconocida	38,1	43,0	32,0

[a] Para el tamaño de los cromosomas de cada especie y número de marcos de lectura abierta *véase* Tabla 15.1.

grande como el de un eucariota inferior. Muchos genes pueden identificarse por su similitud de secuencia con los de otros organismos. Sin embargo, un gran porcentaje de genes secuenciados son todavía de función desconocida. La bioinformática no solamente ayuda a analizar los genes, sino también a caracterizar el tipo de metabolismo y la ecología de un organismo dado.

- ✓ Compare una ORF y una URF.
- ✓ ¿Qué tipo de información permite a uno hacer predicciones sobre el ecosistema de un organismo?

15.4 Evolución y familias génicas

Como se indicó con anterioridad, la primera prioridad de la genómica es determinar el número y la función de los genes en un organismo. Sin embargo, la genómica es algo más que contar los genes y quizá ayudarnos a entender cómo el organismo se adapta y vive en su entorno. La genómica comparativa nos ayuda también a entender las relaciones evolutivas entre los diferentes organismos. Reconstruir las relaciones evolutivas ayuda también a distinguir las formas primigenias de vida y las formas derivadas de ellas. Todo ello ayudará a entender las formas primitivas de vida y a, eventualmente, entender cómo se generó la vida en la Tierra (Sección 11.1).

Duplicación génica y familias génicas

Cuando se describió el cromosoma de *E. Coli* (Sección 10.19) se discutió el hecho de que contenía familias génicas. Esto es verdad para la mayoría de los organismos listados en la Tabla 15.1. Aunque las familias génicas grandes no son la regla, la genómica comparativa muestra que muchos genes han surgido por duplicación de los existentes. Por ejemplo, el 47% de los genes de *B.subtilis* está relacionado con uno o más genes dentro del propio cromosoma. Estos genes se denominan **parálogos** o genes cuya similitud es el resultado de una duplicación génica producida en algún momento de la evolución del organismo en cuestión. (Genes encontrados en un organismo que son similares a los de otro organismo, pero que difieren como consecuencia de la especiación se denominan **ortólogos**.) El estudio de los genes que poseen similaridad de secuencia es una de las cuestiones más importantes y complejas en la genómica comparativa. Como se disponen de secuencias de muchos procariotas, tales comparaciones pueden arrojar luz sobre acontecimientos tempranos que tuvieron lugar en la diferenciación de las protocélulas. Un hecho interesante es que, y como era de esperar, a partir de los estudios de secuencia del rRNA (Capítulo 11), los genes de *Archaea* implicados en la replicación del DNA, transcripción y traducción están más relacionados con *Eukarya* que con *Bacteria*. Sin embargo, muchos de los otros genes están más relacionados con *Bacteria*. Todos estos resultados apoyan la idea sobre el origen de la vida que se propuso basándose en la secuencia del rRNA (Sección 11.5) y sugiere que muchos genes en todos los organismos tienen raíces evolutivas comunes.

Transferencia génica horizontal

Los estudios evolutivos contemplan organismos ancestrales y acontecimientos que tuvieron lugar en tiempos pretéritos. *La transferencia génica horizontal (lateral)* es un proceso que opera actualmente y que dificulta estos estudios evolutivos. Esta transferencia es cuando un organismo toma un gen de otro a veces muy distante evolutivamente. Para ser detectable, la diferencia entre los organismos debe ser muy grande. Por ejemplo, se han descrito varios genes en *Chlamydia* (*véase* Sección 15.3) que claramente tienen un origen eucariótico. La bacteria *Thermotoga maritima* posee más de 400 genes (equivalente a más del 20% de su genoma) que son de origen arqueano y 81 de ellos forman agrupamientos. Esto apoya la idea de que han sido adquiridos horizontalmente a partir de *Archaea* termofílicas que ocupaban el mismo nicho que *T. maritima* y no a partir del desarrollo evolutivo de un ancestro común.

Dos de los organismos listados en la mencionada Tabla 15.1 son patógenos intracelulares obligados, *Chlamydia trachomatis* (Sección 12.27) y *Rickettsia prowazekii* (Sección 12.13). Sus genomas carecen de genes cuyos productos simplemente son aportados por las células hospedadoras y, por tanto, son superfluos para ellos. Como se ha indicado, diversos genes encontrados en *C. trachomatis* parece que son el resultado de una transferencia horizontal de una fuente eucariótica. Ésta es la situación contraria de genes nucleares eucarióticos que han sido transferidos allí a partir del ancestro procariótico de la mitocondria (Sección 11.3). *Rickettsia* está relacionada con las bacterias antecesoras de la mitocondria. De hecho, el genoma de *R. Prowazekii* está sufriendo una reducción similar a la que sufrieron los genomas de las mitocondrias. Muchas de las funciones retenidas por el genoma riquétsico se refieren al metabolismo energético que son precisamente las mantenidas muy fidedignamente por las mitocondrias. Considérese que el 24% del genoma de *R. Prowazekii* no es codificante y éste es el porcentaje más alto de todos los genomas procarióticos estudiados hasta la fecha. Deben de ser restos de genes que fueron y que están siendo eliminados lentamente de sus genomas.

Las consideraciones evolutivas tienen también un componente práctico. La capacidad de identificar genes como procarióticos y, además, de procariotas patógenos puede conducirnos eventualmente a desarrollar agentes terapéuticos extremadamente específicos y poderosos para su uso en medicina clínica.

✓ 15.4 Revisión de conceptos

La genómica puede usarse para el estudio de la historia evolutiva de un organismo dado. Los organismos a menudo contienen familias génicas. Si se originaron por duplicaciones génicas se dicen que son genes parálogos. Los organismos pueden adquirir genes de otros organismos por transferencia horizontal.

- ✓ Compare genes *parálogos* con los *ortólogos*.
- ✓ Describa un mecanismo por el que se pueda haber producido transferencia génica *horizontal* en procariotas.

15.5 Búsqueda y utilización de la información genómica

Como se ha indicado con anterioridad, el análisis genómico proporciona información muy valiosa sobre el metabolismo y ecosistema de un organismo dado. A menudo, sin embargo, el análisis indica que uno o más genes que deberían estar presentes no lo están. Esto indica que o bien el organismo utiliza una ruta nueva o que, al menos, existe un paso bioquímico nuevo. Por tanto, es interesante buscar una proteína que pueda llevar a cabo esta misión.

La búsqueda en bases de datos que contengan la secuencia completa de organismos para buscar un gen específico se denomina **búsqueda y utilización de la información genómica**. El caso de la DNA polimerasa de *Synechocystis* constituye un buen ejemplo.

Todas las bacterias contienen DNA polimerasa similar al DNA polimerasa III de *E. Coli* que es la principal enzima en la replicación del DNA (Sección 7.6). Se trata de una enzima muy compleja que contiene muchas subunidades diferentes; la que cataliza la reacción polimerásica es la dnaE que es producto del gen *dnaE*. Como las DNA polimerasas están muy conservadas y son muy importantes para las células, uno tendería a predecir que cualquier bacteria tendría uno de estos genes con secuencias conservadas (gen ortólogo con respecto al *dnaE*). Sin embargo, la minería genómica en el genoma de *Synechocystis* (Tabla 15.1) no indicó este resultado. En su lugar se encontraron dos marcos de lectura abierta (ORF) que si se combinaban daban un gen similar al mencionado *dnaE*, pero que en esta cianobacteria estaban separados por 700 000 pb y localizados en bandas opuestas del DNA, lo que indicaban que se transcribían en direcciones contrarias. La pregunta era obvia: ¿podían estos dos marcos de lectura formar parte del gen *dnaE*?

Un cuidadoso análisis de secuencia reveló que, efectivamente, los dos marcos codificaban mitades complementarias de una **inteína**, una proteína autoprocesante (*véase* procesamiento de proteínas en Capítulo 8). Estos dos marcos de lectura abierta fueron clonados y hoy se sabe que pueden ser transcritos y traducidos y formar un producto maduro de proteína dnaE (Figura 15.7) que funciona como DNA polimerasa. Es probable que esta reacción también se produzca en la célula *Synechocystis*.

¿Por qué esta cianobacteria organiza el gen *dnaE* de esta manera? En este momento solamente pueden aventurarse hipótesis. Una de ellas implica economía en la regulación de la síntesis de un producto altamente necesario para la célula. Como solamente hay algunas moléculas de proteína dnaE por célula (incluso en *E.coli* en crecimiento activo) es presumible que en un microorganismo de crecimiento muy lento, como el caso que nos ocupa, el número de copias sea más bajo todavía y este particular modo de organización génica sea el idóneo para el metabolismo de la cianobacteria. Por otra parte, es posible que todo ello haya sido fortuito en la evolución de *Synechocystis* y que este modelo se

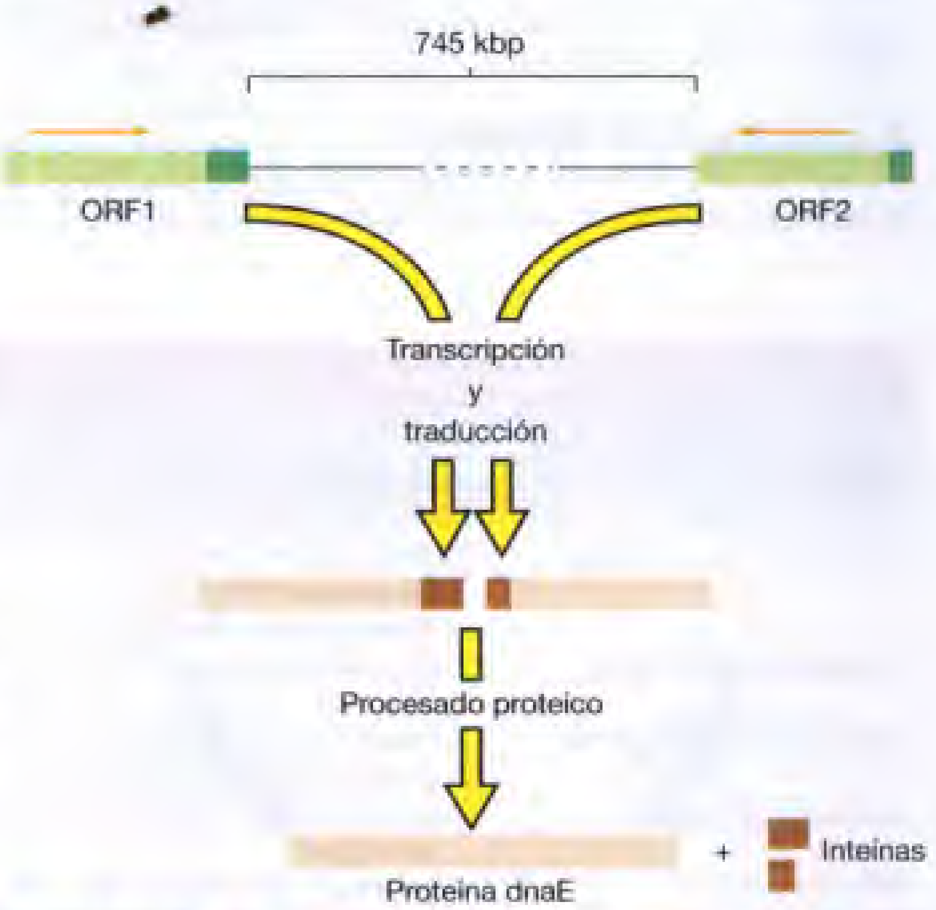


Figura 15.7 El gen *dnaE* partido de *Synechocystis*. Los dos marcos de lectura se transcriben en sentido contrario como se indica por las flechas naranjas. Las proteínas de estos marcos de lectura contiene, cada una, una inteína (nótese que la proteína del marco 2 (ORF2) ha sido pintada en la forma estándar, es decir, del extremo amino hacia el carboxilo).

repita en otros procariotas. Conforme se vayan secuenciando más genomas veremos cuál de estas hipótesis es la correcta. En cualquier caso, es difícil imaginar cómo podría haberse descubierto este mecanismo si no hubiésemos sido capaces de escrutinizar todo el genoma de la cianobacteria y, en definitiva, hacer minería genómica. Es casi seguro que este tipo de actividad nos reportará muchas y buenas sorpresas en el futuro, muchas de las cuales tendrán una aplicación inmediata.

✓ 15.5 Revisión de conceptos

A menudo es necesario buscar cuidadosamente a través de bases de datos para encontrar un gen en particular; esto se denomina minería genómica. Esto puede utilizarse para buscar nuevos genes o para encontrar los predichos.

✓ ¿En qué se diferencia una inteína de un intrón autoempalmado?

15.6 Genomas de microorganismos eucarióticos

Un elevado número de microorganismos son de organización eucariótica (Capítulo 14). Aunque muchos de ellos están bien estudiados, todos los genomas eucarióticos que han sido secuenciados (tales como los de la mosca de la fruta *Drosophila* y la planta *Arabidopsis*) son de organismos pluricelulares, excepto el de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y recientemente el de *Schizosaccharomyces pombe*. La primera de ellas tiene una enorme importancia pues es utilizada en un sinnúmero de aplicaciones industriales y porque es la base de estudios bioquímicos y genéticos para eucariotas inferiores (Capítulo 30).

El genoma de la levadura

El genoma haploide de *S. cerevisiae* contiene 16 grupos de ligamiento o cromosomas en tamaño que van desde 220 kb para el cromosoma I hasta 2352 kb para el XII. El genoma completo de la levadura (excluyendo mitocondria, plásmidos y virus RNA) es aproximadamente de 13 392 kb. El lector se preguntará por qué se utilizan tantas veces palabras tales como «aproximadamente» «alrededor de» y es que la levadura, como muchos otros seres eucarióticos poseen una gran cantidad de DNA repetitivo (Sección 7.4). Cuando se publicó el genoma de *S. cerevisiae* en 1997, no se habían secuenciado todos los repetidos idénticos ya que es difícil hacerlo. El cromosoma XII de la levadura contiene una larga zona de 1260 pb que contiene de 100 a 200 repetidos del operón rRNA (Sección 7.11), que también se llama rDNA; pues bien, esta zona tan complicada desde el punto de vista de la secuencia, no ha sido totalmente desentrañada todavía a pesar de los 6 años transcurridos y, por ello, el tamaño *preciso* del genoma de *S. cerevisiae* no se conoce.

La Tabla 15.3 compara ciertos aspectos del genoma de la levadura con el de otros eucariotas, en este caso de seres multicelulares. Aunque su genoma es con mucho el más pequeño de los indicados, existen otros todavía más pequeños.

Además de las secuencias repetidas vistas en el cromosoma XII para el operón rRNA, *S. cerevisiae* contiene 275 genes de tRNAs y 80 genes para otros tipos de RNA no codificante (Sección 7.16). Existían originalmente previstos 6340 genes codificantes de proteínas, pero un análisis más exhaustivo los ha reducido a 5570. De ellos, 3400 codifican proteínas conocidas y esto se ha deducido bien por el conocimiento *in situ* de la propia levadura o por ser genes ortólogos con respecto a los encontrados en otros organismos. La amplia gama de técnicas bioquímicas y genéticas disponibles para estudiar este organismo ha permitido un gran avance en la comparación de la función de estas proteínas.

Otra forma de explorar la función de proteínas implica la obtención de mutantes en los que se deja no funcional el alelo (de los denominados *knockout*). Estos tipos de mu-

TABLA 15.3 Genomas nucleares eucarióticos[a]

Organismo	Comentario	Tamaño genómico	Número de cromosomas	Genes codificantes de proteínas[b]
Saccharomyces cerevisiae	Industrialmente importante (Secciones 30.12 y 30.13) Modelo de estudios bioquímicos y genéticos	13 Mb	16	5.570
Caenorhabditis elegans	Este gusano es importante para el estudio del desarrollo animal	97 Mb	6	19.099
Drosophila melanogaster	La mosca de la fruta es un organismo fundamental para la Biología	180 Mb	4	13.601
Arabidopsis thaliana	Esta planta sirve como modelo para estudios genéticos	125 Mb	5	25.498
Homo sapiens	El genoma humano está disponible sólo como borrador	3000 Mb	23	25.000–35.000[c]

[a] Todos los datos corresponden a genomas haploides de estos organismos.

[b] El número de genes codificantes para proteínas es en todos los casos un estimado basado en el número de genes conocidos y las secuencias susceptibles de ser funcionales.

[c] Todavía existe debate sobre el número de genes en un genoma humano. Podría ser tan alto como 60.000.

tantes no son posibles de obtener en fase haploide y para un gen implicado en la viabilidad celular. Sin embargo, *S. cerevisiae* puede crecer también en forma diploide (Sección 14.6). Si obtenemos tales mutantes en fase diploide y se observa si los productos meióticos tienen o no viabilidad, puede fácilmente deducirse la implicación del susodicho gen en la viabilidad celular. Utilizando estas técnicas ha sido posible establecer que en la levadura 877 de los marcos de lectura abierta son esenciales, mientras que 3121 claramente no lo son. Nótese que el número de genes esenciales en este eucariota inferior es considerablemente más alto que en los aproximadamente 300 en los procariotas (*véase* Sección 15.3).

En los genes que codifican proteínas en *S. cerevisiae*, solamente existen 225 intrones. La mayoría de los genes que los poseen tienen un pequeño intrón cerca del extremo 5' del gen. Esto es muy diferente de lo que ocurre en otros eucariotas mostrados en la Tabla 15.3. En *Caenorhabditis elegans* un gen normal presenta 5 intrones y en *Drosophila* la media es de 4. También son comunes los intrones en *Arabidopsis* (aproximadamente el 75% de los genes los posee) y, además, los genes normales poseen una media de 5 exones. En el caso de los humanos, casi todos los genes codificantes para proteínas poseen intrones y no es raro que un gen pueda tener 10 o más.

Otros microorganismos eucarióticos

Recientemente se ha realizado un gran esfuerzo en la secuenciación de genomas de microorganismos eucarióticos, incluyendo los de los patógenos *Leishmania major*, *Plasmodium falciparum* (malaria; Sección 27.5), *Candida albicans* (Sección 27.7), *Entamoeba histolytica* (disentería amebiana; Sección 14.9), *Giardia lamblia* (giardiasis; Sección 28.7) y *Pneumocystis carini* (neumomía asociada al SIDA; 26.14). Los genomas de los eucariotas *Encephalitozoon cuniculi* y *Ustilago maydis* están completamente secuenciados pero no fueron inmediatamente publicados.

Ambos son patógenos, el primero es parásito intracelular que causa varias patologías a humanos y otros animales. Carece de mitocondrias y aunque su genoma haploide tiene 11 cromosomas, en total solamente tienen 2,9 Mb, lo que le hace más pequeño que el de muchos procariotas (*véase* Tabla 15.1). *U. maydis* es un hongo fitopatógeno con un genoma de aproximadamente 20 Mb. Causa enfermedades al maíz con un gran impacto comercial. El conocimiento de ambos genomas está ayudando al diseño de nuevas y más poderosas drogas para su control. Poseer un potencial económico grande ha hecho que la secuencia no sea de acceso público para el conjunto de científicos del Planeta.

✓ 15.6 Revisión de conceptos

La secuencia completa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se terminó prácticamente en la década de los 90. Su genoma puede codificar 5777 proteínas de las cuales solamente 877 son esenciales para la viabilidad. Pocos genes contienen intrones.

- ✓ Describa cómo puede demostrarse que un gen es esencial.
- ✓ ¿Bajo qué circunstancias puede imaginar que una secuencia no sea liberalizada para uso público?

15.7 Genomas de orgánulos

En anteriores secciones de este capítulo, se han indicado varias propiedades de genomas procarióticos así como de genomas nucleares de microorganismos eucarióticos. En los Capítulos 9 y 16 se discuten los genomas de algunos virus. Aquí veremos sucintamente los genomas de los orgánulos eucarióticos: cloroplastos y mitocondrias. A veces se refieren a ellos como *genomas extranucleares o citoplasmáticos*.

Ambos genomas se originaron por endosimbiosis de células procarióticas (Secciones 11.3, 14.2 y 14.3). Por ello, no es de extrañar que las proteínas codificadas por sus genomas se parezcan más a las de *Bacteria* que a las de *Eukarya*.

Cloroplastos

El cloroplasto es el orgánulo que lleva a cabo la fotosíntesis (Sección 14.3). Todos los genomas conocidos de cloroplastos son circulares y aunque hay varias copias en cada orgánulo, cada uno de ellos contiene todo el juego completo de genes. El genoma cloroplástico típico es de 120-160 kb y contiene dos repetidos inversos de 6-76 kb (Figura 15.8). Se han completado ya varios genomas de cloroplastos y en la Tabla 5.4 se recoge algunos de ellos. El protozoo flagelado *Mesostigma viride* pertenece a un linaje de plantas separado tempranamente en la evolución. Su genoma contiene más genes codificantes de proteínas y más de tRNAs que cualquier otro cloroplasto conocido y posee una estructura típica como la recogida en la Figura 15.8.

Muchos de los genes del genoma del cloroplasto codifican proteínas implicadas en la fotosíntesis. Sin embargo, el genoma cloroplástico también codifica tRNAs utilizados por el aparato traduccional, así como algunas proteínas utilizadas tanto por el aparato transcripcional como traduccional. También existen restos de genomas cloroplásticos en plantas parásitas que han perdido la mayoría de los genes requeridos para la fotosíntesis.

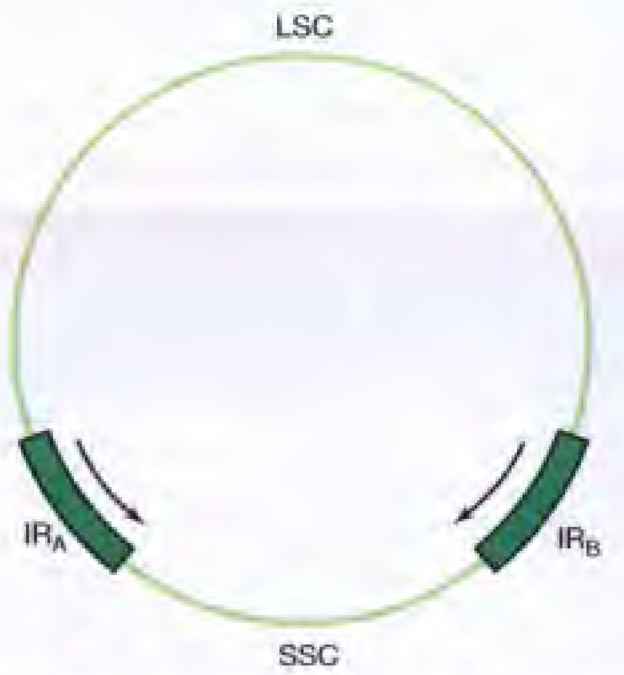


Figura 15.8 Mapa de un genoma típico de cloroplasto. Los genomas de los cloroplastos son circulares del DNA bicatenario. La mayoría contienen repeticiones inversas (IR_A y IR_B) que delimitan una región pequeña de copia única (SSC) y una región grande de copia única (LSC).

Los intrones son mucho más comunes en genomas cloroplásticos que en procarióticos, pero es importante recordar que estos intrones no son como los que se encuentran en genes eucarióticos (Sección 7.12). Aunque algunos cloroplastos tienen intrones, el de *Euglena* (Sección 14.11) tiene 155, lo que equivale al 38% de su genoma.

¿Qué otra cosa, además de pruebas de la hipótesis endosimbiótica, nos ha proporcionado el análisis de los genomas de cloroplastos? En primer lugar, su análisis está contribuyendo a esclarecer las relaciones filogenéticas entre las propias plantas. Algunos genomas de cloroplastos han revelado secuencias muy próximas a ortólogas de *E. coli* como son aquellas de genes que controlan funciones de división celular. Esto apunta a que la división de estos orgánulos pueda ser semejante a la división celular de una *Eubacteria*. De igual manera los genes implicados en transporte membranal son parecidos a los de *Bacteria*.

Mitocondrias

Las mitocondrias están implicadas en la producción de energía y están presentes en la inmensa mayoría e los eucariotas. Recuérdese de la Sección 15.3 que la bacteria parásita intracelular *Rickettsia prowazekii* pertenece al mismo linaje filogenético que el antecesor de las mitocondrias.

Los genomas mitocondriales codifican proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa y, como en el caso de los genomas de cloroplastos, también codifican para rRNAs y tRNAs, y algunas proteínas del aparato transcripcional y traduccional. La mayoría de los genomas mitocondriales codifican menos proteínas que los cloroplásticos. Se han secuenciado más de 200 genomas mitocondriales. El más grande contiene 62 genes que codifican proteínas pero otros oscilan entre 3 y 37 proteínas. La mayoría de los genomas mitocondriales de los animales codifican solamente 13 proteínas (más 22 tRNAs y 2rRNAs) y el de *S. cerevisiae* 8 proteínas. Como se ve, todos ellos sustancialmente más pequeños que los de los cloroplastos. Los genomas mitocondriales grandes son, sobre todo, DNA no codificante. La mitocondria que contiene más genes que codifican proteínas es la del protozoo *Reclinomonas americana* y, aún así, es de solamente 69.034 pb. Además, y mientras que el cloroplasto utiliza el código genético universal, la mitocondria lo utiliza ligeramente diferente (Sección 7.13). Éste parece que ha sido el resultado de presión selectiva para los genomas pequeños. El juego estándar de 22 tRNAs en una mitocondria es, a todas luces, insuficiente para leer e interpretar el mensaje genético, por lo que el emparejamiento de bases codón-anticodón es todavía más flexible en mitocondrias (Figura 7.33).

No es fácil describir un «genoma mitocondrial típico». Al contrario que los genomas de cloroplastos que son moléculas circulares y únicos, los mitocondriales son muy diversos. Inicialmente se pensaba que también eran circulares, pero conforme se ha ido ampliando la investigación en organismos se han encontrado más y más genomas mitocondriales de tipo linear (incluidos algunas algas, protozoos y hongos). En algunos casos como en *S. cerevisiae* aunque el mapeo de restricción apunta hacia una molécula circular, parece que su estado natural *in vivo* es de tipo abierto (recuérdese que el fago T4 posee un genoma genéticamente circular pero que físicamente es linear, Sección 9.9). Algunos organismos incluso poseen más de un genoma mitocondrial.

Los genomas mitocondriales de animales poseen solamente 13 genes que codifican proteínas. La Figura 15.9 muestra un mapa de 16.569 pb del genoma mitocondrial humano que fue secuenciado ya en 1981. El de las levaduras es más grande (85.779 pb) pero solamente posee 8 genes que codifican proteínas. Además de estos genes y los reseñados más arriba para RNAs, el genoma mitocondrial de levaduras contiene largas secuencias de regiones muy ricas en A + T aparentemente carentes de función.

Finalmente hay que indicar que algunos organismos poseen mitocondrias con sus propios plásmidos, lo que hace el análisis genético de sus orgánulos todavía más complicado. Una complicación adicional en el caso de algunos genomas mitocondriales es que a veces es difícil reconocer un gen determinado, incluso cuando poseemos la secuencia del DNA y la de la proteína en cuestión. Esto es debido a la existencia de edición del RNA que veremos a continuación.

Edición del RNA

En el Capítulo 7, se comentó el hecho de que ciertos genes poseyesen regiones codificantes partidas por regiones que no eran denominadas intrones. Recuerde el lector que los in-

TABLA 15.4 Algunos genomas de cloroplastos[a]

Organismo		Tamaño (pb)	Genes codificantes de			Repetidos inversos[b,e]
			Proteínas[c]	tRNA	rRNA[d]	
Chlorella vulgaris	Alga verde	150.613	77	31	1	Ausentes
Euglena gracilis	Protozoo	143.170	67	27	3	Ausentes
Mesostigma viride	Protozoo	118.360	92	37	2	Presentes
Pinus thunbergii	Pino negro	119.707	72	32	1	Presentes[e]
Oryza sativa	Arroz	134.525	70	30	2	Presentes
Zea mays	Maíz	140.387	70	30	2	Presentes

[a] Todos los genomas cloroplásticos son circulares y DNA bicatenario.

[b] Ver la Figura 15.8.

[c] Se incluyen proteínas de función conocida y aquellos marcos que podrían ser funcionales.

[d] Cada unidad es un operón rRNA con genes de cada tipo de rRNA (Sección 7.11).

[e] Aunque los repetidos inversos estén presentes, se encuentran muy truncados.

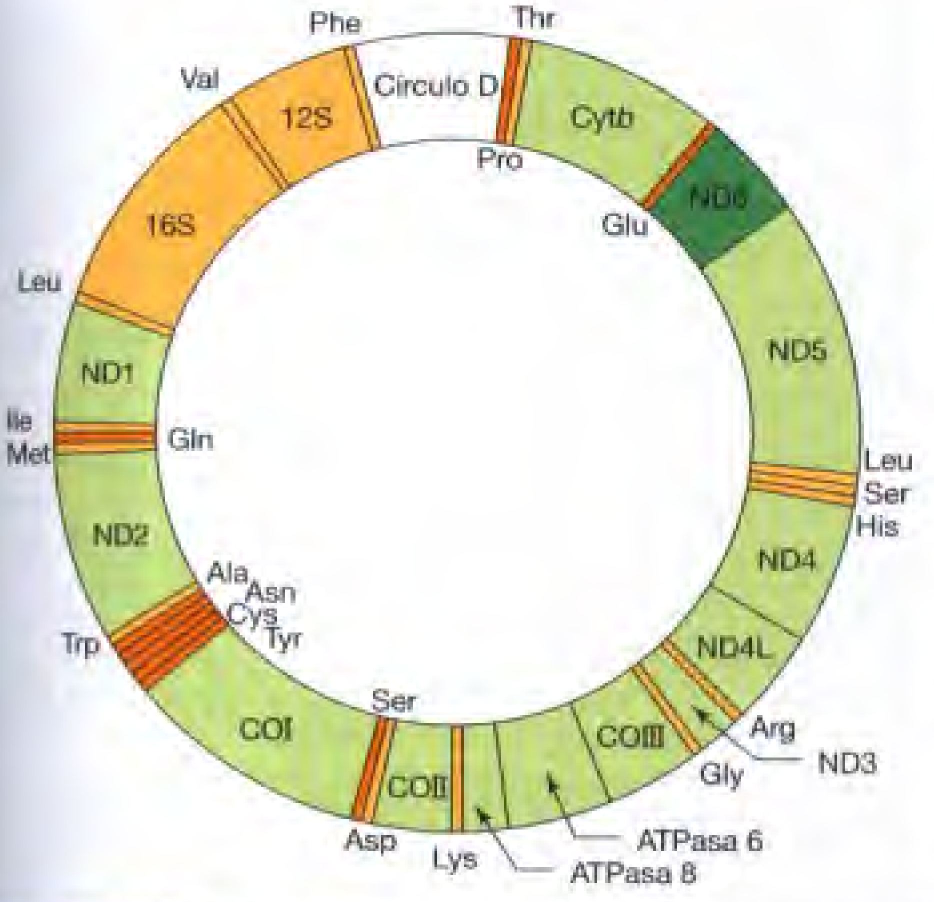


Figura 15.9 Mapa del genoma mitocondrial humano que contiene 16.569 pb. El genoma codifica el 16S y 12 S rRNA (que corresponden a los 16S y 23S rRNA de células procarióticas) así como 22 tRNAs. Estos genes se indican en dos intensidades de naranja, el más oscuro representa los transcritos en sentido contrario a las agujas del reloj y el más claro en el mismo sentido de las agujas del reloj. (Las anotaciones de aminoácidos para los tRNAs están también en la periferia para los transcritos en sentido contrario a las agujas del reloj y por la parte de dentro los que lo son en el mismo sentido de las agujas del reloj.) Los 12 genes codificantes de proteínas se muestran en verde (de nuevo los más oscuros en sentido contrario a las agujas del reloj y los más claros en el mismo sentido). Los genes codifican: *Cytb*, citocromo *b*; ND 1-6, componentes del complejo NADH deshidrogenasa; COI-III, subunidades del complejo citocromo oxidasa; ATPasa 6,8, polipéptidos del complejo ATPasa mitocondrial. Los dos promotores están en la región denominada círculo D, una región implicada en la replicación del DNA.

trones son eliminados cuando la transcripción ha terminado durante un paso del proceso llamado de empalme en el que se forma el mRNA (Sección 7.12). Esto es cierto incluso para el tipo de intrones que se encuentran en las mitocondrias y cloroplastos aunque no son los mismos que los que se encuentran en el núcleo. (En algunos casos es la proteína en sí misma la que es procesada; *véase* procesamiento de proteínas en Capítulo 8.) Existe un fenómeno casi exclusivo de los orgánulos que casi es un proceso contrario al de procesamiento del RNA en los genomas nucleares: se trata de la **edición del RNA**. En él existe un preciso programa de delección e inserción de nucleótidos hasta llegar a un mRNA final que consta de algunos nucleótidos que no estaban presentes en la secuencia original codificada por el DNA mitocondrial.

En las mitocondrias de los tripanosomas y protozoos relacionados (Sección 14.8), algunos transcriptos poseen largas secciones de poliruridilatos añadidas (a veces varios cientos). En la Figura 15.10, se muestra uno de estos ejemplos de edición del RNA. Esta edición está controlada por un pequeño segmento de RNA o «guía» que muestra el camino a la maquinaria enzimática implicada. Evidentemente, este proceso ha de ser muy preciso pues una inserción insuficiente por defecto o por exceso daría lugar a un transcrito con la secuencia corrida y, por tanto, afuncional.

El otro tipo de edición, consiste en cambiar una base en otra es bastante común en las mitocondrias y cloroplastos de animales superiores y plantas. En lugares precisos, una C será convertida en U por desaminación oxidativa (la modificación opuesta es mucho más rara). Existen al menos 25 sitios en los que se produce este tipo de conversión C→U en el caso del cloroplasto del maíz. También se ha descrito al menos un gen nuclear humano que sufre una de estas conversiones.

La existencia de edición del RNA hace muy difícil predecir a partir de una secuencia de DNA qué proteínas codificará un determinado genoma. En el caso de los orgánulos que nos ocupa, no ha sido gran problema por codificar bajo número de proteínas y, además, están altamente conservadas; la situación puede ser muy diferente si en un organismo se detecta como generalizado este proceso de edición de RNA.

Orgánulos y genoma nuclear

Tanto los cloroplastos como las mitocondrias requieren más proteínas que las codificadas en sus genomas. Baste indicar, como ya se dijo, que las mitocondrias en concreto no codifican ninguna proteína requerida para la transcripción. Tampoco poseen información para proteínas estructurales, e incluso, algunas carecen también de determinados genes de la fosforilación oxidativa.

Se estima que la mitocondria de *S. cerevisiae* incluye más de 400 proteínas diferentes de las cuales solamente 8 están codificadas por ella misma. Es decir, la inmensa mayoría de las proteínas vienen codificadas por el núcleo. Aunque podría ser razonable pensar que los genes y proteínas que sirven estas funciones para el núcleo/citoplasma deberían ser localizados en los orgánulos, esto no es así. Mientras que los genes de proteínas organulares se localizan en el núcleo (y son transcritos allí y traducidos en el citoplasma

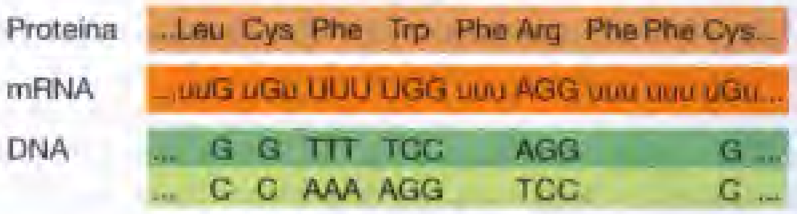

Proteína
..Leu Cys Phe Trp Phe Arg Phe Phe Cys...
mRNA
...uuG uGu UUU UGG uuu AGG uuu uuu uGu...
DNA
... G G TTT TCC AGG G ...
... C C AAA AGG TCC G ...

Figura 15.10 Edición del RNA. La parte superior de la figura muestra una porción de la secuencia de aminoácidos de la subunidad III del enzima citocromo oxidasa del protozoo *Trypanosoma brucei* (*véase* Sección 14.8). Esta proteína es codificada por la mitocondria. Debajo de la secuencia de aminoácidos se muestra la secuencia de ribonucleótidos del mRNA correspondiente a esta región. Las bases en letras en mayúsculas se transcriben desde el gen que se muestra debajo. Las bases en letras minúsculas han sido insertadas en el mRNA por este preciso mecanismo de edición. Aunque el DNA tiene muchos *huecos informacionales*, en la molécula en sí misma no existen huecos. Los espacios entre los pares de bases son simple conveniencia del montaje de la figura para su mejor visualización.

celular) sus productos deben ser transportados hasta los orgánulos.

Una de las primeras proteínas de este tipo estudiadas, estaba implicada en la traducción mitocondrial y se vio que estaba muy relacionada con sus equivalentes de *Bacteria* y no a las de *Eukarya*. Parece lógico concluir que estos genes fueron transferidos desde la mitocondria hasta el núcleo a medida que avanzaba la endosimbiosis.

Hasta el advenimiento de la genómica era muy difícil ganar más información en este sentido. Lo que se requiere es una secuencia del DNA nuclear, la de *Bacteria* muy emparentada con el genoma de la mitocondria y secuencias genómicas de *Bacteria* diferentes para llevar a cabo una comparación adecuada. No se requiere precisamente el conocimiento del genoma de la mitocondria pero sí qué proteínas entran a formar parte del patrimonio del orgánulo. Todos estos requerimientos coincidieron en el caso de *S. cerevisiae*. Sorprendentemente, de los 400 genes que codifican proteínas mitocondriales solamente 50 estaban relacionados con el linaje de bacterias que ha dado lugar a las mitocondrias. Otras 150 estaban claramente relacionadas con *Bacteria* típicas y el resto de 200 no mostraban homologías con genomas bacterianos conocidos. Las proteínas que podríamos llamar «bacterianas» estaban principalmente implicadas en reacciones y conversión energética, traducción y biosíntesis, mientras que las «eucarióticas» eran proteínas membranales de regulación y transporte. Por todo ello, la genómica ha demostrado que la evolución de las mitocondrias es mucho más compleja que lo que se supuso inicialmente.

✓ 15.7 Revisión de conceptos

Los cloroplastos y mitocondrias poseen genomas pequeños independientes de los genomas nucleares. Estos genomas codifican rRNA y tRNAs y diversas proteínas. El genoma de los cloroplastos codifica proteínas implicadas en la fotosíntesis y la mitocondria en la fosforilación oxidativa. Aunque los genomas de estos orgánulos son independientes del nuclear, ellos en sí mismos no lo son. Muchos genes nucleares codifican proteínas que son requeridas para la función del orgánulo.

- ✓ Describa la estructura de los genomas organulares.
- ✓ Describa cuántos genes que codifican función mitocondrial se han hecho residentes del núcleo.

III FUNCIÓN GÉNICA Y REGULACIÓN

15.8 Proteómica

El fin de los estudios genómicos es no sólo describir el complemento génico de un organismo, sino también qué genes se expresan y bajo qué condiciones así como determinar la función de esas proteínas. La sección precedente describía el complemento total de proteínas de la mitocondria en lo que podría denominarse como *proteoma mitocondrial de levaduras*. Un **proteoma** es, por tanto, el conjunto de todas las proteínas de una célula, tejido u organismo en un momento concreto. Note el lector, por tanto, que no se trata simplemente «de las proteínas codificadas por el genoma de una célula u organismo». Aunque el número de genes es siempre constante, el de proteínas no lo es y está cambiando constantemente en respuesta al medio ambiente del organismo o a su desarrollo. El estudio a gran escala, en el ámbito del genoma, de las proteínas (estructura, función y regulación) de un organismo se denomina **proteómica** o **genómica funcional**.

Una aproximación inicial a la proteómica fue el uso de *electroforesis bidimensional de poliacrilamida* para separar, identificar y medir las proteínas de una muestra. Como otro tipo de electroforesis, la separación se basa en la carga de las moléculas. En la Figura 15.11, se muestra una de estas electroforesis de las proteínas de *E. Coli*. En la primera dimensión (horizontal en la figura) las proteínas se separan según sus puntos isoeléctricos, esto significa que migran en el gradiente de pH hasta que la carga neta de una proteína dada es 0. En la segunda dimensión, las proteínas se desnaturalizan de tal manera que cada resto de aminoácido da una carga fija. Las proteínas se separan entonces por tamaño (de la misma manera que las moléculas del DNA son separadas por tamaño; Figura 10.35). En la década de los 70,

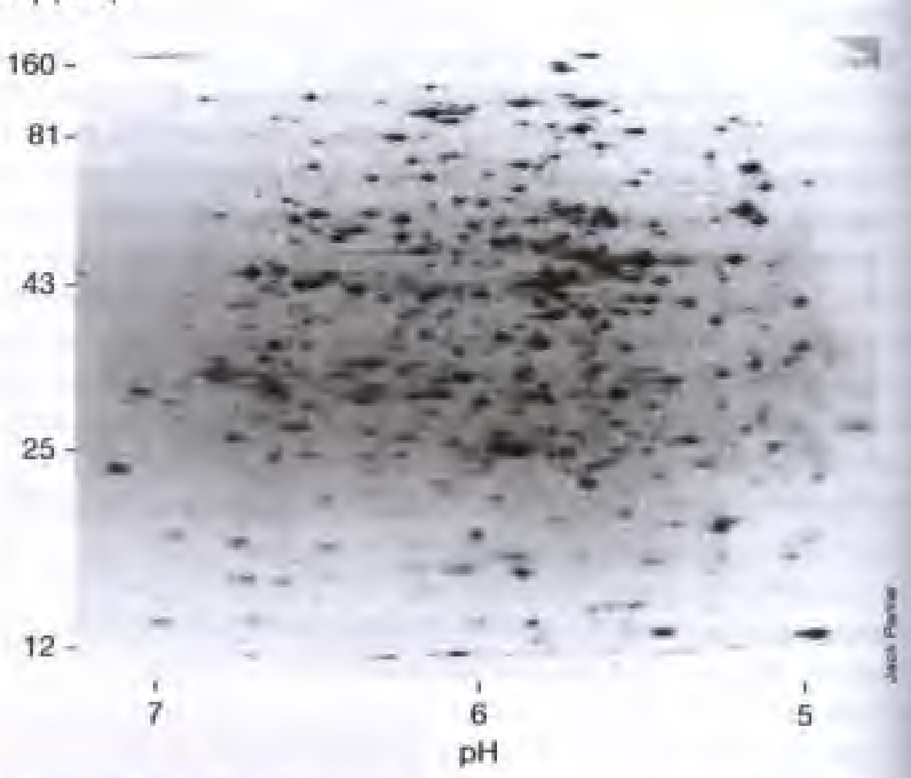


Figura 15.11 Electroforesis bidimensional de poliacrilamida para separación de proteínas. La figura muestra la autorradiografía de las proteínas de *E. Coli* creciendo en medio mínimo. Cada mancha es una proteína. El marcaje se realizó con metionina radiactiva durante el crecimiento para su visualización posterior (exposición de un film fotográfico) y cuantificación (cortando y computando cada mancha individual). Las proteínas primero se separaron por punto isoeléctrico bajo condiciones desnaturalizantes, prestando particular atención al intervalo de pH 5-7, que es donde enfocan la mayoría de las proteínas de esta bacteria (las proteínas básicas ribosomales no se encuentran representadas en esta figura). La segunda dimensión separa las proteínas según su masa, encontrándose las más grandes en la parte superior del gel. Debido a las condiciones utilizadas, las proteínas complejas se han desnaturalizado en sus subunidades.

Frederick C. Neidhardt y sus colegas comenzaron un estudio intensivo de las proteínas de *E. Coli* y su regulación. Se han identificado varios cientos de proteínas por medios bioquímicos y genéticos y se ha estudiado su regulación bajo muchas condiciones. Los métodos bioquímicos de separación y análisis, tales como medios cromatográficos y espectrometría de masas y técnicas genéticas como los estudios de mutagénesis mediada por transposones (Secciones 10.11 y 10.18) y la construcción de librerías génicas fusionantes (Sección 31.4) son utensilios muy importantes. La proteómica todavía requiere de experimentación además de análisis computerizado muy intensivo.

Es evidente que de la experimentación *in silico* se obtienen pistas muy valiosas sobre la función proteica pero lo cierto es que más de la mitad de los genes de cualquier organismo que se secuenciase hoy mismo carecería de función que uno le pudiera asignar o ni siquiera predecir como resultado de esta investigación *in silico*.

Genómica funcional y estructural

Aunque la proteómica a menudo requiere experimentación intensiva, uno no puede descartar tales actividades de bioinformática. Después de obtener la secuencia genómica de un organismo, el análisis inicial comparará su secuencia con la de otros organismos para localizar e identificar genes ya conocidos. Aquí la secuencia más importante es la de aminoácidos en la proteína. Debido a la degeneración del código genético (Sección 7.13), las diferencias en la secuencia del DNA no necesariamente tienen repercusión en diferencias de aminoácidos de la proteína (Figura 15.12).

Hay una fuerte evidencia de que las proteínas con identidad de secuencia superior al 50%, presentan normalmente similar función. Existen, sin embargo, notables excepciones a esta regla. Por ejemplo, hay dos proteínas de *Pseudomonas* con 98% de identidad de secuencia que sin embargo, catalizan reacciones diferentes. Una pista importante para asignar función a una proteína es la identificación de regiones de la secuencia que estén identificadas en otras proteínas, tales como secuencias de unión de metales o dominios de unión de GTP. Estos dominios tienen secuencias específicas, pero lo que los hace funcionales es la estructura tridimensional (Sección 3.8).

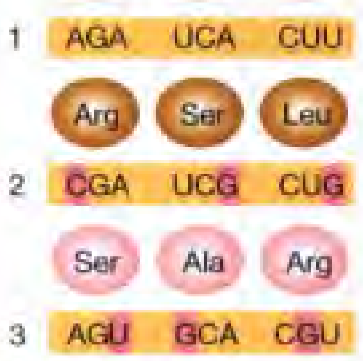


Figura 15.12 Comparación de secuencias nucleotídicas similares y sus respectivos aminoácidos. Las secuencias 2 y 3 difieren de la 1 en sólo tres posiciones. Sin embargo, los aminoácidos codificados por las secuencias 1 y 2 son idénticos, mientras que los codificados por la secuencia 3 son diferentes.

La genómica estructural es la determinación de las estructuras tridimensionales de las proteínas representativas de un organismo. El ideal último es conseguir un cuerpo doctrinal de información estructural que permita a la investigación *in silico* predecir la estructura y función probables de cualquier proteína a partir de los datos de secuencia codificante.

Acoplando la genómica y la proteómica, se conseguirán datos muy valiosos que nos permitirán empezar a entender como los organismos integran la expresión de su genoma en relación con los diferentes estímulos que recibe del exterior. La perspectiva de investigación básica en estos campos es enorme; no obstante el inicio ha arrancado desde posturas aplicadas. Esto incluye, por ejemplo, al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos antibióticos.

✓ 15.8 Revisión de conceptos

A proteoma es el conjunto de todas las proteínas de un organismo presentes en un momento dado. La meta de la Proteómica es el estudio de estas proteínas para aprender sobre su estructura, función y regulación.

✓ ¿Puede un organismo tener más de un proteosoma?

15.9 Micromatrices (*microarrays*)

Aunque la genómica funcional y estructural requieren todavía de mucho trabajo, han sido muy ayudadas por cambios rápidos en la tecnología. Un fin de la proteómica es el estudio de la regulación de la expresión génica. Recuerde el lector que la expresión génica es muy a menudo regulada en el ámbito de la transcripción (Capítulo 8). Se ha hecho accesible un nuevo y poderoso utensilio que permite analizar, de una vez, toda la transcripción de un genoma completo: *micromatrices* (*microarrays*).

Para que se exprese un gen debe transcribirse. Conociendo bajo qué condiciones se transcribe el gen, también puede proporcionar información sobre su función. Por ejemplo, un gen que codifique para el metabolismo de la maltosa se encontrará entre los transcritos cuando la bacteria crezca en maltosa pero no cuando lo haga con glucosa (Sección 8.6).

En el Capítulo 10, se indicó cómo la hibridación de ácidos nucleicos ayuda a localizar genes específicos en fragmentos del DNA (Sección 10.12). La hibridación también se ha utilizado desde hace mucho tiempo para medir la expresión génica hibridando el mRNA con fragmentos del DNA. Esta técnica se fomentó con el desarrollo de *micromatrices (microarrays o microchips) del DNA*, en los que genes o fragmentos de ellos representando todo el genoma del organismo se disponen espacialmente en un soporte sólido. Estos genes (o fragmentos de gen) pueden ser hibridados con una serie de sondas y luego ser analizados en computadora.

Existen varias formas de hacer estas micromatrices (*microarrays*) y una de ellas se muestra en la Figura 15.13. Esta figura también ilustra cómo puede usarse dicha micromatriz (*microarray*). La Figura 15.14 muestra parte de un chip actual utilizado para ensayar la expresión del genoma de *S. cerevisiae*.

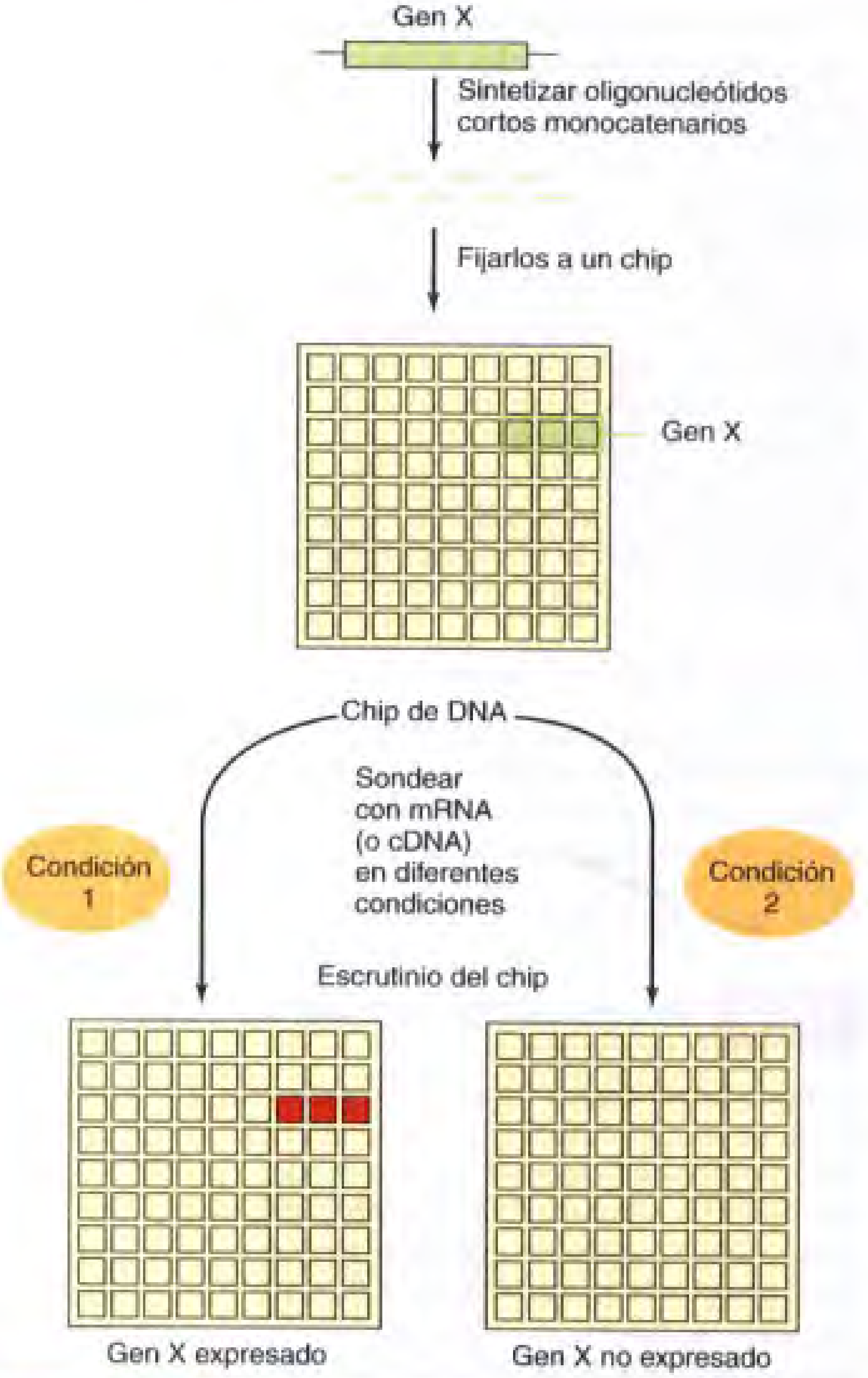


Figura 15.13 Realización de un chip del DNA. Secuencias cortas monocatenarias correspondientes a todos los genes de un organismo. Se sintetizan individualmente (Sección 10.13) y se fijan en puntos conocidos e identificables de un soporte sólido. Aquí se idealiza el ejemplo para un solo gen. Estos chips de DNA se ensayan utilizando sondas marcadas obtenidas del organismo creciendo bajo diversas condiciones y así determinar el patrón de expresión génica.

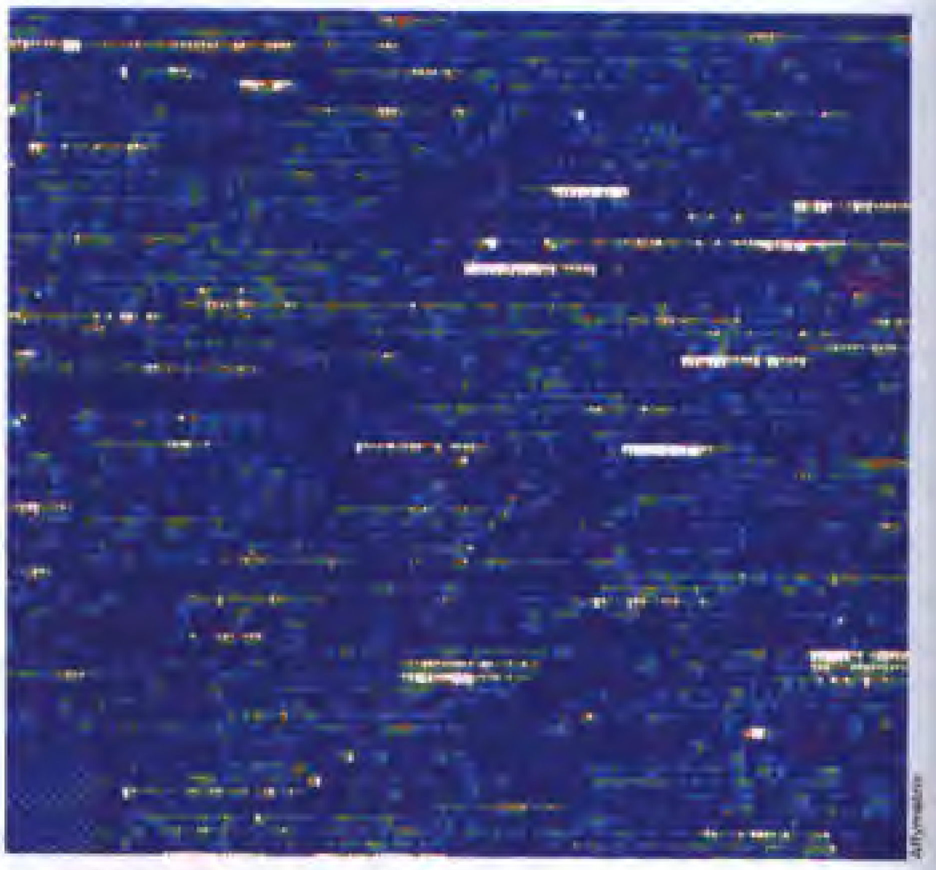

Affymetrix

Figura 15.14 Chips de DNA y su uso para ensayar la expresión génica. La fotografía muestra fragmentos de aproximadamente 1/4 del genoma de *S. cerevisiae* fijado a un chip de silicio. Cada gen está presente en varias copias y han sido sondeados con mRNAs fluorescentes obtenidos de la levadura creciendo bajo condiciones determinadas. El fondo de la figura es azul. Los puntos de hibridación se muestran como gradación de color hasta llegar a la máxima hibridación que es blanco. Como se conoce la localización de los diferentes genes en el chip así se conoce los genes que fueron expresados y los que no.

A principios de los 90, se encontró que el mismo proceso utilizado para la producción de chips de computadora (fotolitografía), podía utilizarse para que cada uno contuviese miles de fragmentos del DNA. Normalmente se pueden sintetizar varios cientos de miles de fragmentos del DNA de secuencia conocida en un chip de silicio de 1-2 cm (*véase* Figura 15.13). Se han manufacturado chips del DNA que contienen los 5600 genes que codifican proteínas de la levadura *S. cerevisiae* y cada una en posición perfectamente definida. Estos chips pueden hibridarse con sondas de DNA o RNA marcadas de diferentes formas. Después de la hibridación, el chip será leído por un láser y analizado en una computadora. Se observarán distintos patrones de hibridación, dependiendo de qué secuencias RNA o DNA complementarias estén presentes en la muestra.

Previamente hemos analizado la hibridación utilizando una sonda única correspondiente a un único gen (Sección 10.12). Con un chip del DNA se puede utilizar sondas muy complejas. Por ejemplo, se puede investigar cuál de los más de 5000 genes de *S. cerevisiae* están siendo expresados bajo ciertas condiciones simplemente sondeando con toda la población de mRNAs. Por supuesto, se puede comparar la expresión de diferentes genes bajo condiciones distintas. La capacidad de analizar de una manera relativamente simple la expresión simultanea de miles de genes tanto cualitativa como cuantitativamente tiene un tremendo potencial para ayudarnos a entender la complejidad tan extrema de organismos simples como *E. Coli* o incluso nosotros mismos con nuestros 25.000-35.000 genes.

La micromatrices o chips del DNA también pueden usarse para la identificación de organismos. Se puede usar como sonda fragmentos del DNA de un determinado organismo y diferenciar entre cepas relacionadas por los modelos de hibridación. Esto permite una rápida identificación de agentes patogénicos tanto virales como bacterianos y, por supuesto, la identificación de cepas particulares en brotes epidémicos. Esta tecnología también sirve para la identificación y cuantificación de organismos específicos en comunidades microbianas del ambiente; un fin común a todos los ecólogos microbianos (Capítulo 19).

✓ 15.9 Revisión de conceptos

Las micromatrices (*microarrays*) son genes o fragmentos de genes fijados a un sustrato sólido y en orden identificable. Éstos pueden utilizarse para ser hibridados con sondas y luego analizados para así determinar los modelos de expresión génica. Estas matrices de DNA son lo suficientemente amplias como para garantizar una representación génica total y el análisis de transcripción de todo el genoma.

- ✓ ¿Cómo pueden usarse las micromatrices (*microarrays*) para monitorizar la expresión de un gen?
- ✓ ¿Por qué puede ser útil conocer la expresión génica de un genoma completo en el contexto de una condición en particular?

Preguntas de repaso

1. Algunos proyectos de secuenciación genómica son dirigidos por mapas (*contigs*) pero otros son realizados de una manera aleatoria. Explique la diferencia entre ellos.
2. En *Bacteria* y *Archaea* el acrónimo del inglés ORF es casi sinónimo de gen. Sin embargo, en los eucariotas superiores esto no es estrictamente cierto. Explíquelo.
3. Los organismos de la Tabla 15.1 están listados según el tamaño del cromosoma. Sin embargo, el tamaño del cromosoma puede no siempre ser un reflejo fiel del tamaño del genoma. Explíquelo.
4. El gen que codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa de *E.coli* se dice que es ortólogo con el gen *rpoB* de *Bacillus subtilis*. ¿Qué implica sobre la relación de ambos genes? ¿Qué proteína supone que es codificada por el gen de la Gram positiva? Los genes para los diferentes factores sigma (*véase* Tabla 8.2) de *E. Coli* son parálogos. ¿Qué se deduce de la relación entre esos genes?
5. Explique de qué manera la transferencia horizontal de genes puede complicar los estudios evolutivos.
6. Los genes nucleares pueden codificar proteínas que funcionan en mitocondrias y cloroplastos. ¿Cómo se importan en los orgánulos (*véase* Sección 7.16)?
7. Distinga entre genoma y genómica, proteoma y proteómica.

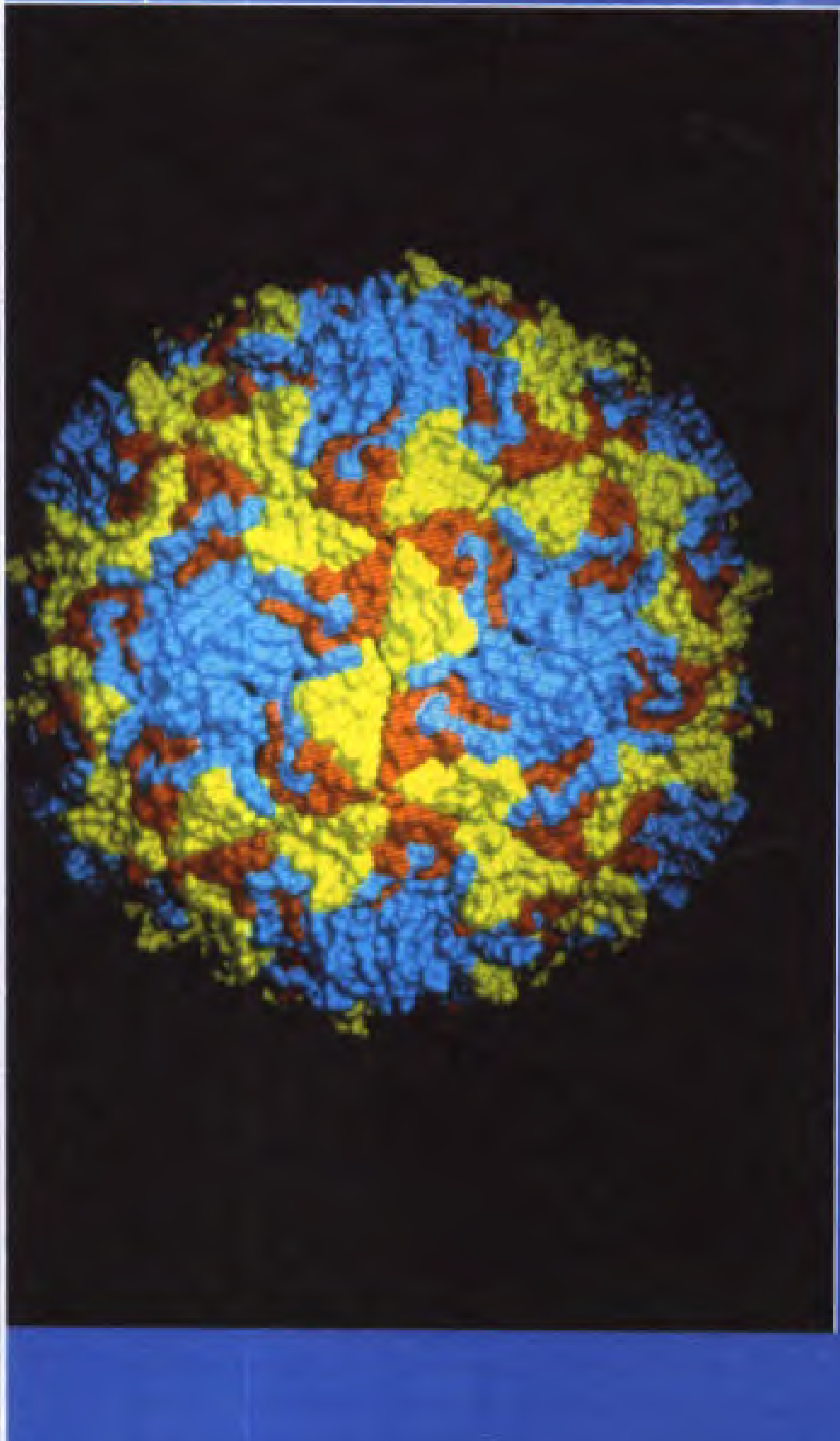
Ejercicios prácticos

1. Cuando se utilizan endonucleasas de restricción para tratar de clonar fragmentos «aleatorios», una táctica es digerir parcialmente con una restrictasa de la que se supone existen muchos puntos de restricción en el DNA en cuestión. ¿Qué propiedades del sitio de restricción y del DNA del organismo son importantes para predecir con qué frecuencia aparecerán esos sitios de restricción en el DNA (Sección 10.12)?
2. Una aproximación para la obtención de fragmentos aleatorios del DNA es hacer una digestión parcial con una enzima de restricción. Para obtener fragmentos «aleatorios» de aproximadamente 10 kb, ¿por qué es mejor utilizar una enzima que reconozca 4-bp que otro que reconozca 6 u 8 bp?
3. Asuma que ha clonado un fragmento del DNA utilizando la enzima *Bam*HI, en el sitio *Bam*HI de M13mp18. Para un clon individual, la hebra del DNA clonada que se encuentra en el fago maduro depende de la orientación del fragmento clonado. Explíquelo utilizando diagramas.
4. Cuando se utiliza una técnica de secuenciación aleatoria es posible la existencia de «huecos» de secuencia. Describa cómo es posible cerrar estos huecos utilizando una librería de clones BAC.
5. En la década de los 90, se publicó el genoma nuclear de *S. cerevisiae*, pero la secuencia completa nunca se determinó por completo. Los genomas mitocondriales de levaduras han demostrado que son muy difícilmente secuenciados con certeza. Describa, en ambos casos, las dificultades prácticas que se encontraron durante la realización de sus secuencias respectivas.
6. ¿Cómo se podría estudiar experimentalmente qué proteínas de *E. coli* están reprimidas (Sección 8.5) cuando un cultivo se pasa de medio mínimo que contiene una sola fuente de carbono a uno complejo con diferentes aminoácidos, bases y vitaminas?

Los virus infectan todo tipo de organismos, desde bacterias hasta seres humanos. Los virus bacterianos (bacteriófagos) se estudian a menudo como sistema modelo de los procesos moleculares que tienen lugar en los organismos celulares. Los virus que infectan plantas se estudian generalmente a causa de su impacto en la agricultura. Los que infectan humanos, por sus consecuencias en la salud. Algunos de los grandes azotes de la humanidad, como la viruela o la polio, están causados por virus (se muestra aquí un modelo de poliovirus realizado por computadora). A menudo los diferentes virus muestran estrategias distintas de replicación. Uno de los mejores instrumentos para la clasificación de los virus se basa en sus estrategias replicativas.

16

VIRUS DE BACTERIAS, PLANTAS Y ANIMALES



I VIRUS DE PROCARIOTAS 513
16.1 Bacteriófagos con RNA 513
16.2 Bacteriófagos con DNA unicatenario: viriones icosaédricos 515
16.3 Bacteriófagos con DNA unicatenario: viriones filamentosos 517
16.4 Bacteriófagos con DNA bicatenario: T7 518
16.5 Bacteriófagos con DNA bicatenario: un virus transponible 520

II VIRUS DE EUCARIOTAS 522
16.6 Virus de plantas 522
16.7 Virus de animales con RNA de cadena positiva 524
16.8 Virus de animales con RNA de cadena negativa 525
16.9 Virus con RNA bicatenario: reovirus 528
16.10 Replicación de virus de animales con DNA bicatenario 529
16.11 Virus con DNA bicatenario: herpesvirus 531
16.12 Virus con DNA bicatenario: poxvirus 532
16.13 Virus con DNA bicatenario: adenovirus 533
16.14 Virus que utilizan la transcriptasa inversa 534

Glosario

Bacteriófago virus que infecta células procariotas

Ácido nucleico de cadena menos (negativa) una cadena de RNA o DNA que tiene el sentido opuesto (es decir, que es complementaria) del mRNA de un virus

Ácido nucleico de cadena más (positiva) una cadena de RNA o DNA que tiene el mismo sentido que el mRNA de un virus

Forma replicativa molécula de DNA bicatenario que es un intermediario en la replicación de virus con DNA unicatenario

Retrovirus un virus RNA cuyo genoma tiene un DNA intermediario como parte de su ciclo replicativo

Transcripción inversa el proceso de copia en el DNA de la información contenida en el RNA

Virión la partícula vírica completa; el ácido nucleico rodeado por una cubierta proteica y, en algunos casos, otros materiales

Virus un elemento genético que contiene RNA o DNA, que se replica en las células, pero que tiene un estado extracelular

Este capítulo sobre los virus forma parte de una unidad sobre la diversidad microbiana. Complementa el Capítulo 9, en el cual introdujimos los principios de la virología. Sin embargo, en aquel capítulo sólo dimos información detallada de algunos de los virus que se conocen. En este capítulo discutiremos los diversos tipos de virus.

Los capítulos previos a esta unidad han explorado la enorme diversidad de *Bacteria* y de *Arquea*, y han iniciado en la diversidad de *Eucaria*. En la unidad que sigue veremos cómo esta riqueza genética se manifiesta con una gran diversidad de estrategias metabólicas y en hábitat muy diferentes. Antes de seguir adelante en este capítulo, es importante recordar que los virus no tienen metabolismo independiente y que el hábitat en el que se reproducen es una célula viva. Sin embargo, esto no significa que los virus no sean muy diversos; todo lo contrario. Se sabe que diferentes virus infectan la mayor parte de los tipos de organismos (hospedadores, *véase* Sección 9.3), y que los virus se adaptan al modo de vida de sus hospedadores. Pero el área de mayor interés en la diversidad de los virus es posiblemente la diversidad de sus genomas. Mientras que las células tienen siempre DNA bicatenario como material genético, en los virus el material genético puede ser uno de los siguientes tipos: RNA unicatenario, RNA bicatenario, DNA unicatenario o DNA bicatenario (*véase* Sección 9.1). La clasificación de los virus de Baltimore emplea los tipos de genomas víricos y sus estrategias de replicación para dividir los virus en varias clases (*véase* Sección 9.7). En este capítulo, ilustraremos la diversidad vírica discutiendo algunos tipos concretos de virus en diversas clasificaciones. No obstante, separaremos nuestra discusión en los virus que infectan procariotas y los que infectan eucariotas. Las diferencias entre estos dos tipos de células se manifiestan a menudo en los ciclos de vida de los virus que las infectan (*véase* Sección 9.11).

I VIRUS DE PROCARIOTAS

Desde hace tiempo se conocen muchos virus que infectan *Bacteria* y va aumentando el número de virus que se sabe que infectan *Arquea*. Sin embargo, limitaremos nuestra discusión a algunos tipos que infectan *Bacteria*. En el Capítulo 9, mencionamos que la mayor parte de los bacteriófagos conocidos tienen genomas de DNA bicatenario (*véase* Sección 9.8). A pesar de eso, se conocen muchos bacteriófagos con otros tipos de genomas. Los más simples son los que tienen genomas de RNA.

16.1 Bacteriófagos con RNA

Se conocen muchos bacteriófagos que tienen genomas de RNA de configuración positiva. Es interesante señalar que los virus RNA de las bacterias entéricas infectan solamente las células bacterianas que contienen un tipo de plásmido, denominado *plásmido conjugativo* (*véase* Sección 10.9), que permite el funcionamiento de la célula como un *donador* (o «macho») en un tipo determinado de intercambio genético (el interesante concepto de bacterias «macho» y «hembra» se discute en el Capítulo 10). Esta limitación a células bacterianas donadoras se deriva del hecho de que estos virus infectan las bacterias adhiriéndose a los *pelos*, o *fimbrias sexuales* (Figura 16.1), que son codificados por el

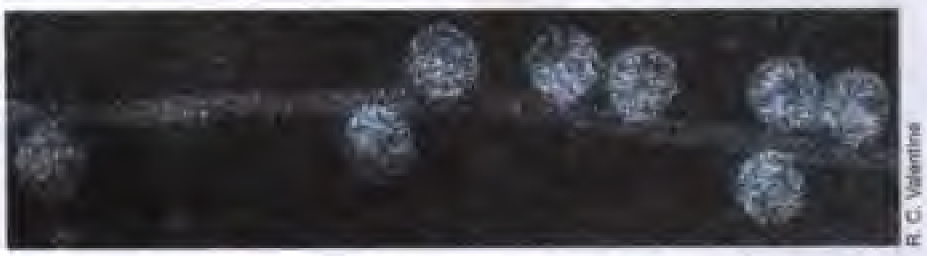

R. C. Valentine

Figura 16.1 Micrografía electrónica del pelo de una célula donadora («macho») de *Escherichia coli*, mostrando adheridos unos viriones de un fago RNA pequeño.

plásmido. Como las células que carecen del plásmido no poseen tales pelos, estos virus RNA son incapaces de unirse a ellas, y por tanto no inician la infección en las células denominadas *receptoras* («hembra»).

Todos los virus bacterianos RNA son muy pequeños, con un tamaño de unos 26 nm y todos presentan simetría icosaédrica, con 180 copias de la proteína de la cubierta por cada partícula vírica. Se conoce la secuencia nucleotídica completa del RNA del genoma de varios fagos. El genoma del fago MS2, que infecta *Escherichia coli*, consta de 3569 nucleótidos. La cadena RNA del virión actúa directamente como mRNA al entrar en la célula (*véase* Figura 9.11).

El mapa genético del MS2 se muestra en la Figura 16.2*a* y las etapas de su multiplicación en la Figura 16.2*b*. El pequeño genoma codifica sólo cuatro proteínas. Éstas son la **proteína de maduración** (presente en copia única en la partícula vírica madura), la **proteína de la cubierta** o **cápsida**, la **proteína lítica** (responsable del proceso de lisis que ocasiona la liberación de partículas víricas maduras), y una subunidad de la **RNA replicasa,** la enzima que lleva a cabo la replicación del RNA vírico. Hay que destacar que la RNA replicasa es una proteína mixta, formada por un polipéptido codificado por el virus y por otros polipéptidos del hospedador. Los polipéptidos del hospedador que forman parte de la replicasa vírica son elementos de la maquinaria usual de traducción de la célula. Así, el virus emplea estos polipéptidos, que normalmente tienen una función completamente distinta, y los usa para hacer su replicasa activa.

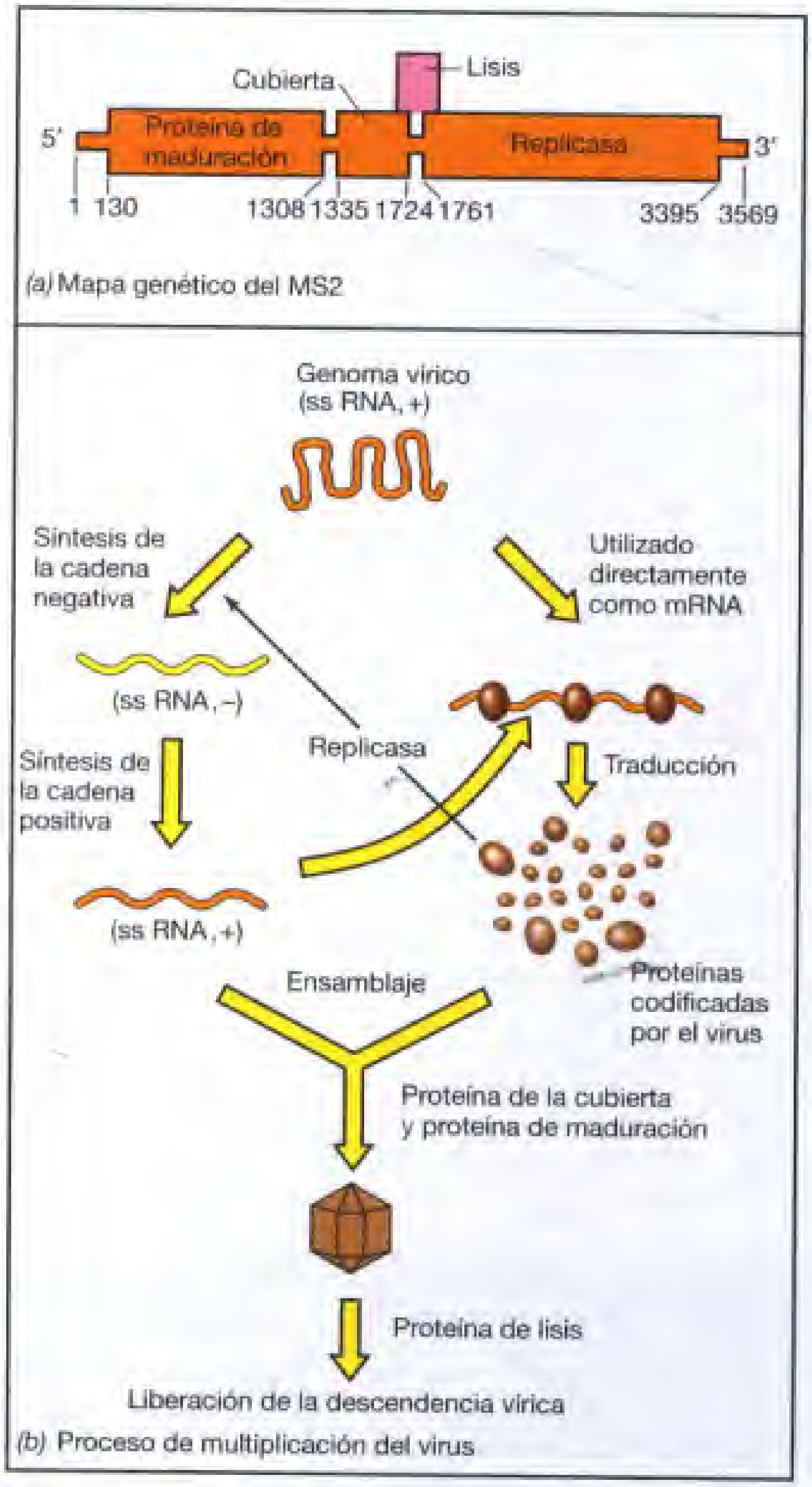

Cubierta
Lisis
5'
Proteína de maduración
Replicasa
3'
1
130
1308
1335
1724
1761
3395
3569
(a) Mapa genético del MS2
Genoma vírico (ss RNA, +)
Síntesis de la cadena negativa
Utilizado directamente como mRNA
(ss RNA, –)
Síntesis de la cadena positiva
Replicasa
Traducción
(ss RNA, +)
Ensamblaje
Proteínas codificadas por el virus
Proteína de la cubierta y proteína de maduración
Proteína de lisis
Liberación de la descendencia vírica
(b) Proceso de multiplicación del virus

Figura 16.2 (a) Mapa genético del bacteriófago MS2, que tiene RNA. (b) Proceso de multiplicación del virus. Los números en (a) indican la posición de los nucleótidos en el RNA.

Como se ha indicado, el RNA vírico tiene polaridad positiva y, por tanto, puede ser traducido inmediatamente. Después de que se sintetiza la replicasa se puede sintetizar el RNA de polaridad opuesta, usando el RNA infectivo como molde (*véase* Figura 9.11). Tras la síntesis de este RNA de sentido negativo se pueden producir más cadenas de RNA positivo, usando ahora como molde el RNA de cadena negativa. Como resultado, las cadenas de RNA formadas de nuevo con polaridad positiva sirven como mensajeros para continuar la síntesis de proteínas víricas. El gen de la proteína de maduración se encuentra en el extremo 5' del RNA. La traducción del gen que codifica esta proteína (de la que se necesita sólo una molécula por partícula vírica) ocurre específicamente a partir de la forma naciente del RNA de cadena positiva que se forma durante el proceso de replicación. De este modo, la cantidad de proteína de maduración que se forma es limitada. El RNA vírico se pliega, adoptando su estructura secundaria una disposición compleja. De los cuatro sitios de iniciación AUG, el que resulta más accesible para la traducción es el que corresponde a la proteína de la cápsida, y su traducción comienza muy pronto. La secuencia de mRNA de la replicasa también se traduce en una fase temprana. A medida que las proteínas de la cápsida aumentan en número en el interior de la célula, se combinan con el RNA en las proximidades del sitio de iniciación AUG de la replicasa, inhibiendo la síntesis de esta enzima. La principal proteína vírica sintetizada es la de la cápsida, que es la que se necesita en mayores cantidades.

Otra característica destacable del bacteriófago MS2 es que la proteína *lítica* está constituida por un gen que se *solapa* tanto con el gen de la proteína de la cápsida como con el de la replicasa (*véase* el mapa genético de la Figura 16.2*a*). El fenómeno de **solapamiento de genes** es común en genomas muy pequeños (*véase* Sección 16.2). Debe apreciarse que, aunque la utilización del solapamiento génico permite un uso más eficiente de la información genética, su existencia complica mucho el proceso evolutivo, pues una mutación en la región del solapamiento puede afectar simultáneamente a dos genes. El codón de iniciación del gen de la proteína lítica no es fácilmente accesible a los ribosomas debido a la estructura secundaria del RNA. La estructura secundaria en esta región se altera cuando el ribosoma termina la traducción del gen de la proteína de la cápsida y esta distorsión permite a veces al ribosoma iniciar la lectura del gen de la proteína lítica. Limitando de esta manera la eficiencia de la traducción, es probable que se evite la lisis prematura de la célula. Así, la lisis comenzará solamente después de que se hayan logrado suficientes copias de la proteína de la cápsida para el ensamblaje de partículas víricas complejas.

Finalmente, se produce el ensamblaje del fago y la liberación de los viriones a consecuencia de la lisis celular. Las propiedades de replicación de estos virus con RNA tan simples son también sencillas. El propio RNA vírico funciona como un mRNA y la regulación se produce principalmente mediante el control del acceso de los ribosomas a los sitios apropiados de iniciación de lectura en el RNA vírico.

Aunque se conocen diferentes bacteriófagos RNA de cadena positiva, todavía no se ha identificado ninguno con genoma RNA de cadena negativa. Sin embargo, se sabe que hay algunos bacteriófagos que tienen RNA unicatenario segmentado como material genético. De ellos, el mejor estudiado es φ6, cuyo hospedador es *Pseudomonas syringae*. Se trata de un virus con envoltura (*véase* Figura 9.12), que parece estar estrechamente relacionado con los retrovirus (*véase* Sección 16.9), que infectan eucariotas.

✓ *16.1 Revisión de conceptos*

Hay una variedad de virus RNA que infectan bacterias. El pequeño genoma RNA de estos virus bacterianos actúa directamente como mRNA y sólo codifica unas pocas proteínas.

✓ ¿Cuál es la diferencia entre los virus RNA de cadena positiva y negativa?

✓ ¿Qué se quiere decir cuando se habla de *genes solapados*?

16.2 Bacteriófagos con DNA unicatenario: viriones icosaédricos

Se conocen varios bacteriófagos cuyos viriones contienen un genoma con DNA unicatenario. Son los virus correspondientes a la Clase II de la Clasificación de Baltimore. Antes de que se transcriba el genoma se tiene que sintetizar una cadena complementaria de DNA (*véase* Sección 9.7 y Figura 9.11). Todos los bacteriófagos de la Clase II se empaquetan únicamente en el DNA de cadena positiva (es decir, no se conocen bacteriófagos con DNA negativo). En esta sección trataremos de uno de esos fagos, el φX174, que ha tenido una gran importancia en los estudios de replicación del DNA. En la siguiente sección trataremos el bacteriófago filamentoso unicatenario M13, que es un instrumento de extremo interés en ingeniería genética y cuyo ciclo vital es diferente del φX174.

El bacteriófago φX174 es uno más entre diversos virus similares con genoma DNA unicatenario circular y virión icosaédrico. Estos virus son muy pequeños, de unos 25 nm de diámetro, y el elemento principal para la construcción de la cubierta proteica es una sola proteína presente en 60 copias (el número mínimo de subunidades proteicas posibles en un virus icosaédrico), a la que se adhieren otras proteínas en los vértices del icosaedro para fabricar estructuras fusiformes (*véase* Figura 9.12). Estos diminutos virus DNA poseen solamente una pequeña cantidad de información genética en sus genomas. En la replicación de los virus DNA se usa la maquinaria replicativa del DNA de la célula hospedadora.

El genoma del fago φX174

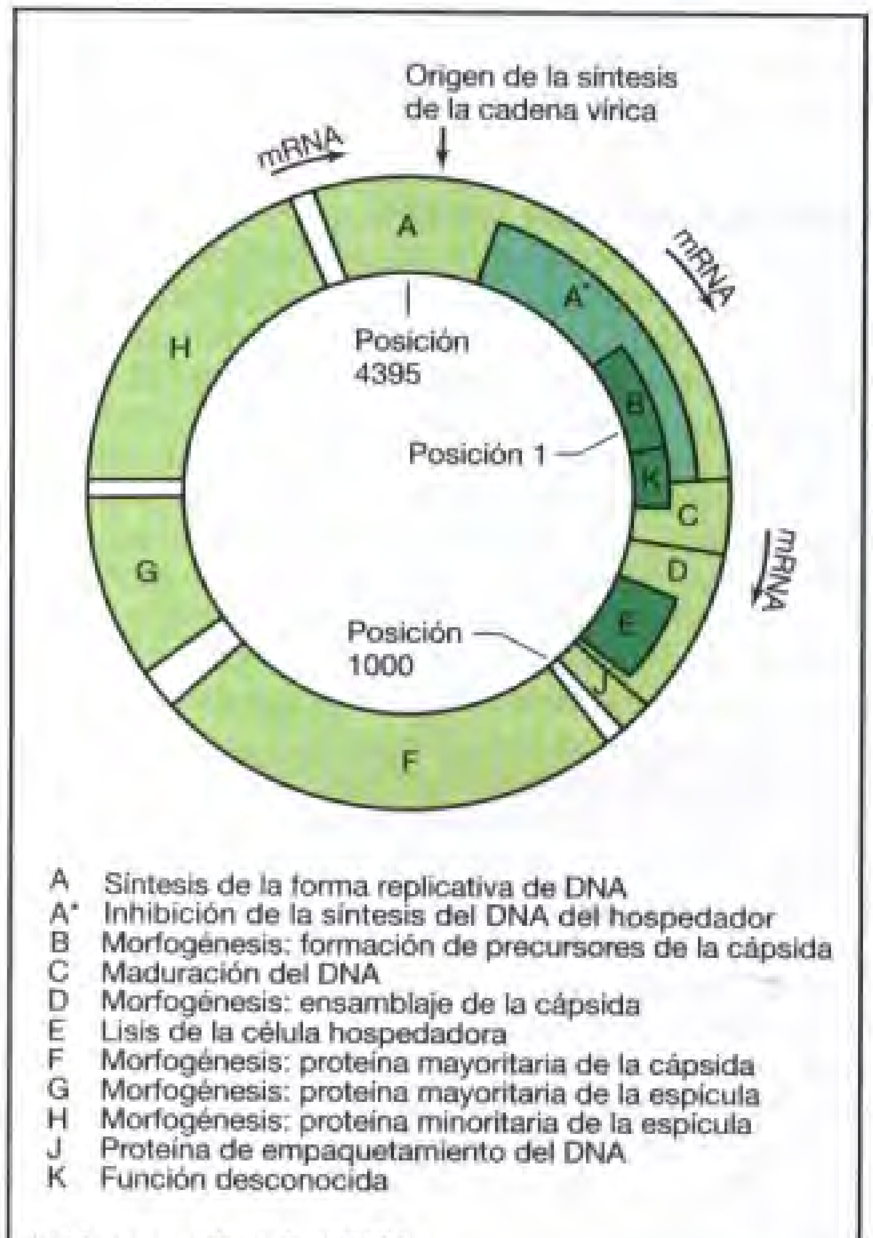
El fago φX174 infecta *Escherichia coli*. Su genoma consta de una molécula circular y unicatenaria de 5386 nucleótidos. El DNA del φX174 fue el primero en secuenciarse totalmente, lo que supuso un logro notable para el grupo de Frederick Sanger en 1977. Actualmente la secuenciación de DNA es un proceso rutinario (*véase* Sección 10.13). El fago φX174 es interesante también porque fue el primer elemento genético en el que se demostró la existencia de *genes solapados* (*véase* Sección 16.1). En virus muy pequeños, como el φX174, no hay suficiente DNA para codificar todas las proteínas especificadas por el virus, a menos que algunas secuencias nucleotídicas víricas se lean más de una vez en diferentes fases de lectura (Figura 16.3).

Como se aprecia en el mapa genético de φX174, las secuencias de los genes D y E se solapan, y el gen E está contenido por completo *dentro* del gen D. Además, el codón de terminación del gen D se solapa con el codón de iniciación del gen J. En el genoma del φX174 ocurren otros ejemplos de solapamiento (Figura 16.3). Además, de una pequeña proteína codificada por el gen A, la llamada proteína A*, se forma por *reiniciación de la traducción* (no de la transcripción) dentro del mRNA del gen A, con lo que la proteína A* es leída y terminada a partir de la misma fase de lectura del mRNA que la proteína A, pero con un punto de iniciación en un codón interno diferente.

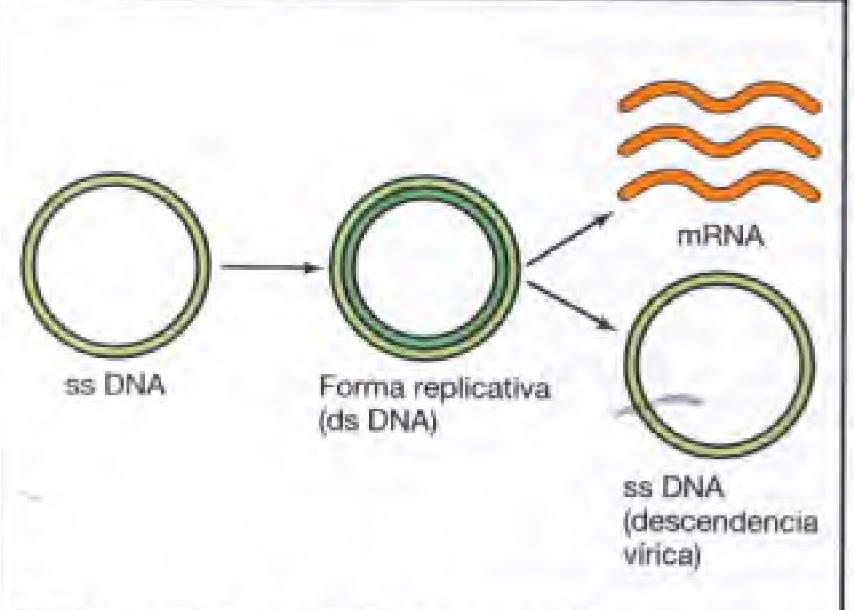
Replicación del DNA por el mecanismo del círculo rodante

El proceso de replicación de una molécula de DNA circular y unicatenario presenta un interés considerable porque el DNA celular se replica siempre en una configuraicón bicatenaria (*véase* Sección 7.5). La cadena de DNA en fagos con DNA unicatenario tiene sentido positivo. En la infección, esta cadena de DNA se separa de la proteína de la cubierta y su entrada en la célula se acompaña de su conversión a una forma de DNA bicatenario, llamada la **forma replicativa** (FR) (Figura 16.3*b*). Las proteínas celulares que intervienen en la conversión del DNA vírico a FR-DNA son enzimas como la *primasa*, *la DNA polimerasa*, la *ligasa* y la *girasa*. El virus no codifica ninguna proteína para llevar a cabo esta conversión.

En las células, la replicación de la cadena copiada en forma discontinua requiere la formación de RNA *cebadores* cortos mediante una enzima llamada *primasa* (*véase* Sección 7.5). Estos RNA cebadores se forman de modo discontinuo sobre la cadena copiada y luego se eliminan y reemplazan por DNA mediante la DNA polimerasa (*véase* Figura 7.19). La replicación del DNA de φX174 es similar pero, por supuesto, el DNA es un círculo cerrado unicatenario. Para iniciar la replicación de este DNA, la primasa sintetiza de un pequeño RNA cebador en uno o más sitios específicos de iniciación. El DNA se sintetiza a continuación por la DNA polimerasa III y el cebador queda eliminado y es reemplazado por DNA mediante la DNA polimerasa I, exacta-


Origen de la síntesis
de la cadena vírica
mRNA
mRNA
mRNA
A
A*
B
K
C
D
E
J
F
G
H
Posición 4395
Posición 1
Posición 1000
A Síntesis de la forma replicativa de DNA
A* Inhibición de la síntesis del DNA del hospedador
B Morfogénesis: formación de precursores de la cápsida
C Maduración del DNA
D Morfogénesis: ensamblaje de la cápsida
E Lisis de la célula hospedadora
F Morfogénesis: proteína mayoritaria de la cápsida
G Morfogénesis: proteína mayoritaria de la espícula
H Morfogénesis: proteína minoritaria de la espícula
J Proteína de empaquetamiento del DNA
K Función desconocida

(a) Mapa genético de ϕX174


ss DNA
Forma replicativa
(ds DNA)
mRNA
ss DNA
(descendencia
vírica)

(b) Proceso de multiplicación del virus ϕX174

Figura 16.3 Bacteriófago ϕX174, un fago con DNA unicatenario. (a) Mapa genético. Adviértase que hay regiones con genes solapados (A/B, K/B, K/C, K/A, A/C y D/E). Las regiones intergénicas no están coloreadas. La proteína A* se forma usando sólo parte de la secuencia que codifica el gen A por reiniciación de la traducción (*véase* el texto). (b) Proceso de multiplicación del ϕX174. La producción de la descendencia de ss DNA a partir de la forma replicativa ds DNA se realiza por el modelo de replicación del círculo rodante y se muestra con más detalle en la Figura 16.4.

mente igual que en el caso de la cadena copiada. Esto origina la formación de la forma replicativa completa de DNA bicatenario circular o FR-DNA.

Una vez que se ha formado el intermediario replicativo, la replicación del DNA ocurre mediante replicación semiconservativa convencional a través de formas intermediarias (*véase* Figura 7.16), dando lugar a la formación de nuevas moléculas de FR-DNA. Sin embargo, la formación de genomas víricos unicatenarios supone un tipo de mecanismo replicativo diferente denominado **replicación en círculo rodante** (Figura 16.4). El círculo rodante surge cuando se rompe una cadena y el extremo 3′ de este corte se usa como cebador para la síntesis de una nueva cadena. La rotación continuada del círculo conduce a la síntesis de una estructura unicatenaria lineal. La síntesis es asimétrica porque sólo una de las cadenas sirve como molde. Esto contrasta con lo que ocurre con el fago lambda, en el que ambas cadenas se replican cuando la infección está avanzada mediante un mecanismo de círculo rodante (*véase* Figura 9.20). En el ϕX174, la síntesis comienza cuando la proteína codificada por el gen A, llamada *proteína A*, rompe la cadena positiva de FR. Cuando la longitud de la cadena en crecimiento alcanza el equivalente a una unidad del genoma vírico (5386 residuos en el caso del ϕX174), la proteína A rompe y luego liga los dos extremos de la cadena recién sintetizada para formar un DNA unicatenario circular.

Transcripción y traducción del ϕX174

La síntesis de mRNA vírico está dirigida por el FR-DNA. La síntesis de mRNA comienza en distintos promotores principales y termina en varios sitios (*véase* el mapa, Figura 16.3). Las moléculas de mRNA policistrónico (Sección 7.11) son traducidas después en distintas proteínas fágicas. Como se ha podido observar, algunas proteínas se obtienen de los transcritos formados a partir de diferentes fases de lectura de las mismas secuencias de DNA (genes solapantes). Resulta impresionante la eficiencia con la que un genoma tan pequeño como el de ϕX174 puede manifestar múltiples funciones.

Por último, se produce el ensamblaje de las partículas víricas maduras. La liberación de viriones de la célula es el resultado de la lisis celular, un proceso en el que participa la proteína codificada por el gen E. Es interesante observar que la proteína E actúa inhibiendo la actividad de una de las enzimas que participan en la síntesis de peptidoglicano de la pared celular. La lisis celular se produce a causa de la fragilidad de ese material de nueva.

✓ 16.2 Revisión de conceptos

El genoma del DNA unicatenario del virus ϕX174 es tan pequeño que sólo la presencia de genes solapantes permite la codificación de sus funciones esenciales. Este virus proporcionó el primer ejemplo de genes solapantes. La producción del DNA de la descendencia vírica se produce mediante un mecanismo de círculo rodante.

- ✓ Si el ácido nucleico del genoma del ϕX174 tiene configuración positiva, ¿por qué no se puede usar directamente como mRNA?
- ✓ ¿En qué difiere la forma replicativa del ácido nucleico vírico de la del ácido nucleico encontrado en el virión?

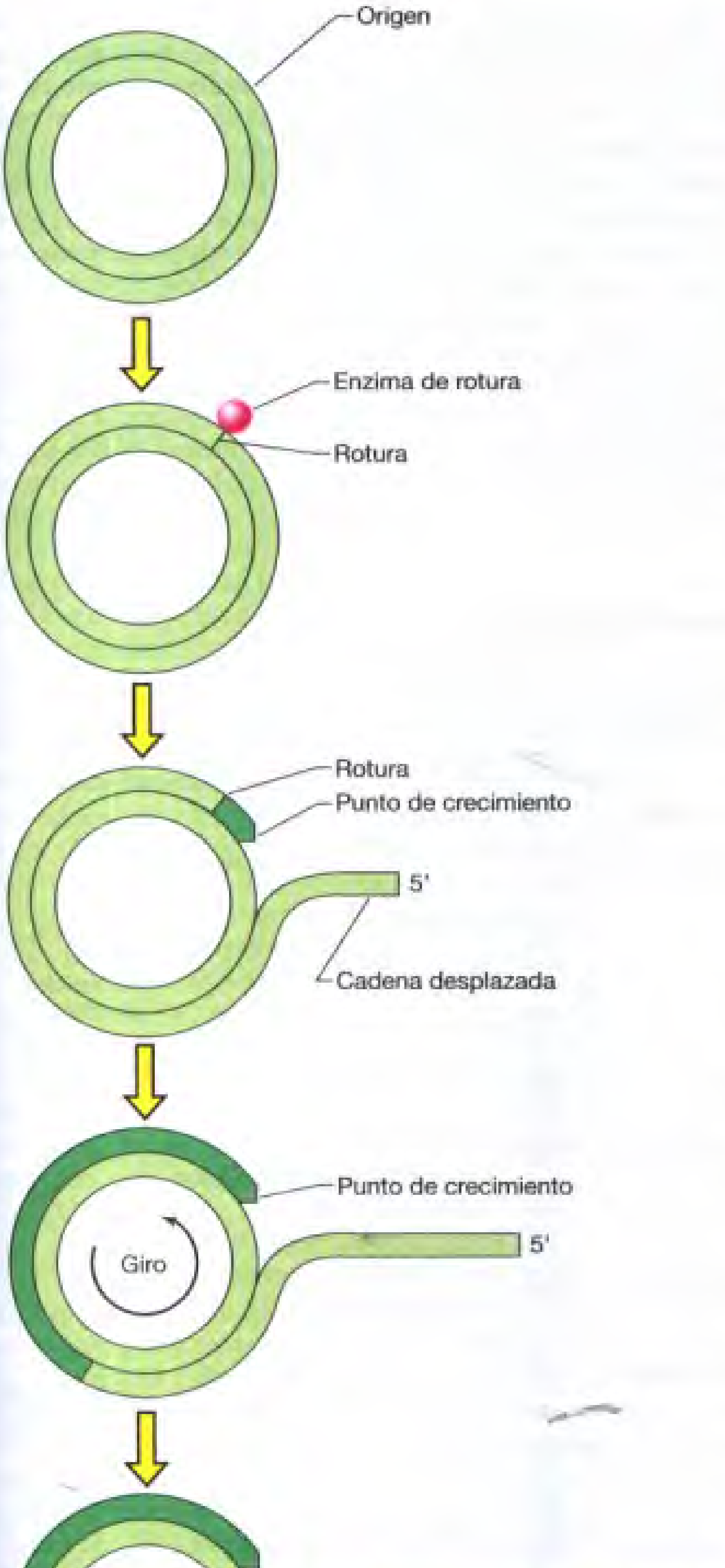


Figura 16.4 Replicación por el modelo del círculo rodante. La replicación empieza en el punto de origen por rotura de una cadena de DNA (en el ϕX174 la cadena rota es la cadena positiva y la proteína del gen A es la encargada de la rotura). Después de que se ha sintetizado una nueva cadena (una vuelta del círculo), la proteína del gen A corta la cadena nueva y liga sus dos extremos.

16.3 Bacteriófagos con DNA unicatenario: viriones filamentosos

Los fagos filamentosos con DNA son muy distintos del ϕX174 y presentan simetría helicoidal en vez de icosaédrica. El fago M13 es el miembro más estudiado de este grupo, que infecta a *Escherichia coli*, pero los fagos f1 y fd también están incluidos en este grupo. Como ocurre en los bacteriófagos pequeños con RNA, estos fagos filamentosos con DNA infectan solamente células donadoras, pues penetran tras la fijación a pelos o fimbrias sexuales (*véase* Sección 10.9). Aunque estos fagos son lineales (filamentosos), contienen un DNA *circular unicatenaria*. El DNA no es autocomplementario, de modo que las dos mitades de la molécula circular que ocupa la partícula vírica en toda su extensión forma enlaces en los extremos, pero exhiben muy poco apareamiento de bases. El fago M13 tiene amplio uso como vector de clonación y vehículo de secuenciación de DNA en estudios de ingeniería genética (*véase* Sección 15.1). El virión del M13 tiene sólo 6 nm de ancho pero 860 nm de largo. Estos fagos filamentosos con DNA tienen además la interesante propiedad de liberarse de la célula *sin* causar la muerte de la célula hospedadora. Por tanto, una bacteria infectada con el fago M13 puede continuar creciendo mientras libera partículas víricas. La infección vírica causa un cierto retraso en el crecimiento celular, pero la célula es capaz de coexistir con su virus. Se puede observar, por tanto, la formación de calvas, que aparecen como áreas de crecimiento celular reducido sobre el resto del césped bacteriano no infectado.

Muchos aspectos de la replicación del DNA en los fagos filamentosos son similares a los del ϕX174. La liberación sin muerte celular tiene lugar por un proceso de gemación mediante el cual el extremo de la partícula vírica que contiene la proteína A sale siempre de la célula en primer lugar (Figura 16.5). No existe acumulación intracelular de partículas víricas; el ensamblaje de los viriones maduros ocurre a nivel de la cara interna de la membrana citoplasmática y tal ensamblaje está acoplado al proceso de gemación.

Algunas propiedades de estos fagos los convierten en vehículos adecuados para el clonaje y secuenciación de DNA. En primer lugar, tienen DNA unicatenario, lo que significa que la secuenciación se puede realizar por el método de dideoxinucleótidos de Sanger (*véase* Sección 10.13). Segundo, mientras que las células infectadas se mantengan en crecimiento pueden ser conservadas indefinidamenre con el DNA clonado, de modo que suponen una fuente continua y disponible del DNA clonado. Tercero, poseen un espacio intergénico que no codifica proteínas y que puede ser reemplazado por cantidades variables de DNA foráneo.

✓ 16.3 Revisión de conceptos

Algunos virus con DNA unicatenario, como M13, poseen viriones filamentosos. Estos virus son muy útiles en la secuenciación del DNA. Poseen además la propiedad de poder reproducirse y ser liberados sin necesidad de matar al hospedador.

- ✓ ¿Cómo pueden liberarse virus M13 sin matar la célula hospedadora infectada?

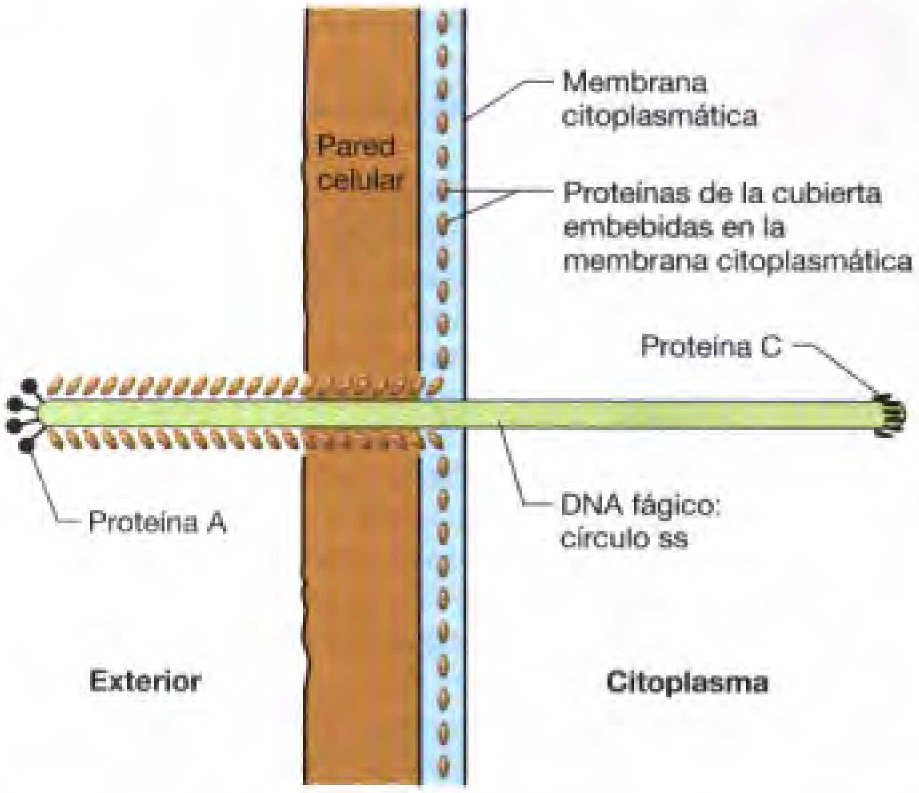

Membrana
citoplasmática
Pared
celular
Proteínas de la cubierta
embebidas en la
membrana citoplasmática
Proteína C
Proteína A
DNA fágico:
círculo ss
Exterior
Citoplasma

Figura 16.5 Ilustración del modo por el que el virión de un fago filamentoso unicatenario (tal como M13 o fd) sale de la célula infectada sin lisarla. La proteína A pasa primero a través de la membrana en el lugar en el que se han embebido primero las moléculas de la proteína de la cubierta. El DNA circular intracelular está recubierto por dímeros de otra proteína fágica, que es desplazada por la proteína de la cubierta a medida que el DNA pasa a través de la membrana citoplasmática intacta.

16.4 Bacteriófagos con DNA bicatenario: T7

Los bacteriófagos con DNA bicatenario se encuentran entre los microorganismos mejor estudiados y ya se han tratado dos de ellos, T4 y lambda (*véanse* Secciones 9.9 y 9.10). Hay otros dos ejemplos que vamos a tratar en ésta y en la sección siguiente por su importancia como modelos para la comprensión de la biología molecular y la regulación genética. Son los bacteriófagos T7 y Mu.

Replicación del bacteriófago T7

El bacteriófago T7, así como el estrechamente relacionado T3, son virus relativamente pequeños que contienen DNA y que infectan *Escherichia coli*. (Algunas cepas de *Shigella* y *Pasteurella* son también hospedadoras de T7.) El virión tiene cabeza icosaédrica y una cola muy pequeña (*véase* Figura 9.12).

El genoma del T7 es una molécula lineal de DNA bicatenario con 39.936 pares de bases. Cerca del 92% del DNA del T7 codifica proteínas. En el genoma del T7 también se presentan genes solapados, así como otras estrategias del tipo de la reiniciación traduccional interna y del cambio de fase de lectura dentro de ciertos genes, aparentemente para optimizar la economía genética.

En la Figura 16.6 se muestra el mapa genético del T7. El orden de los genes influye sobre la regulación de la multiplicación vírica. Cuando el virión se fija a la célula bacteriana el DNA se inyecta linealmente, y los genes del «extremo izquierdo» del mapa genético siempre entran los primeros en la célula. Varios genes de este extremo izquierdo del DNA se transcriben inmediatamente por la RNA polimerasa celular usando tres promotores que están muy próximos espacialmente. Una de estas proteínas tempranas inhibe el sistema de restricción del hospedador. Esta proteína se sintetiza antes de que el genoma del T7 entre por completo en la célula. Otra de estas proteínas tempranas es una RNA polimerasa vírica, denominada RNA polimerasa T7. Otras dos moléculas de mRNA temprano codifican proteínas que detienen la acción de la RNA polimerasa del hospedador, inhibiendo por tanto la transcripción de los genes tempranos así como la transcripción de los genes celulares. Por tanto, la RNA polimerasa del hospedador sólo se usa para transcribir unos pocos genes iniciales y para obtener el mRNA que codi-

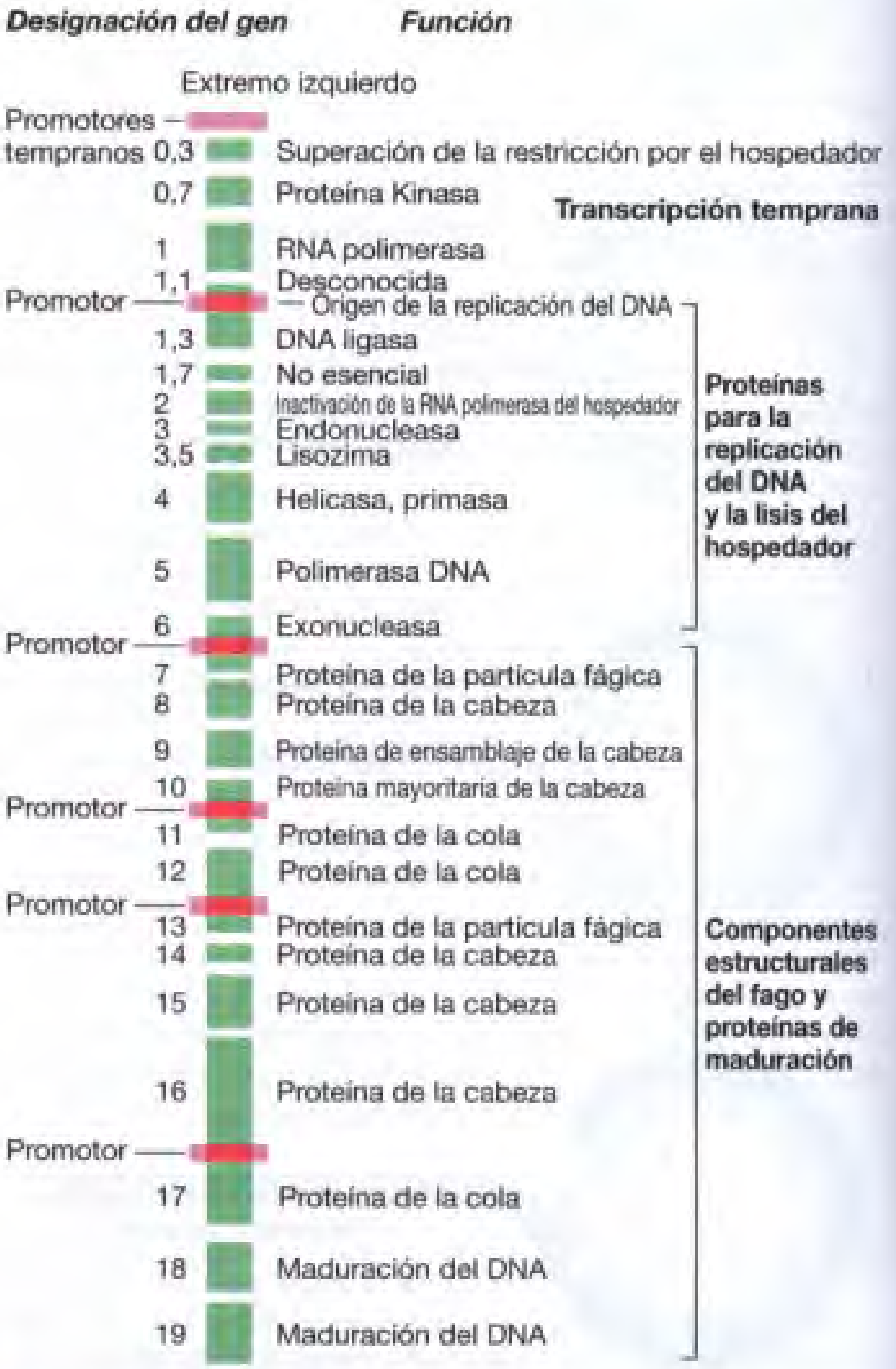
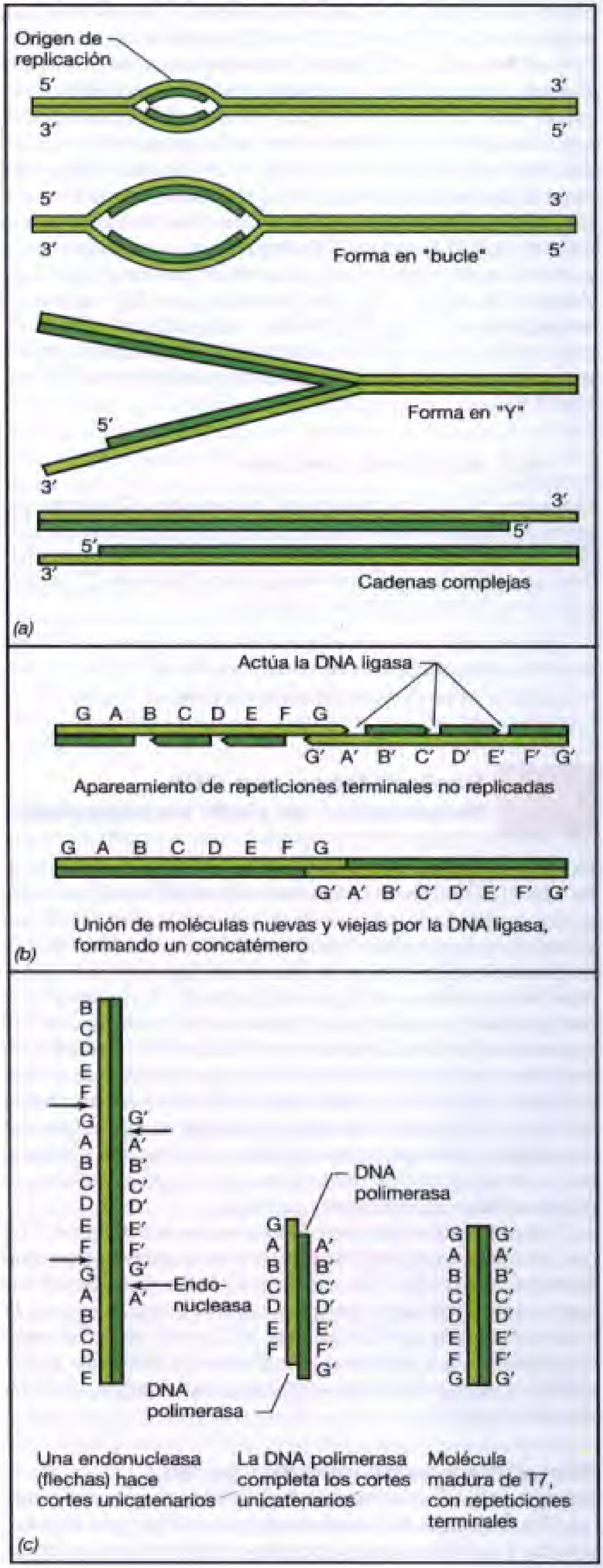

Designación del gen
Función
Extremo izquierdo
Promotores tempranos
0,3 Superación de la restricción por el hospedador
0,7 Proteína Kinasa
Transcripción temprana
1 RNA polimerasa
1,1 Desconocida
Promotor
Origen de la replicación del DNA
1,3 DNA ligasa
1,7 No esencial
2 Inactivación de la RNA polimerasa del hospedador
3 Endonucleasa
3,5 Lisozima
4 Helicasa, primasa
5 Polimerasa DNA
6 Exonucleasa
Proteínas para la replicación del DNA y la lisis del hospedador
Promotor
7 Proteína de la partícula fágica
8 Proteína de la cabeza
9 Proteína de ensamblaje de la cabeza
10 Proteína mayoritaria de la cabeza
Promotor
11 Proteína de la cola
12 Proteína de la cola
Promotor
13 Proteína de la partícula fágica
14 Proteína de la cabeza
15 Proteína de la cabeza
16 Proteína de la cabeza
Promotor
17 Proteína de la cola
18 Maduración del DNA
19 Maduración del DNA
Componentes estructurales del fago y proteínas de maduración

Figura 16.6 Mapa genético del fago T7 que muestra los números de los genes, sus tamaños aproximados y las funciones de los productos génicos. La transcripción de los promotores tempranos la realiza la polimerasa RNA del hospedador. La transcripción de los demás promotores la realiza la polimerasa RNA del T7. Los genes se designan por números.

fica la RNA polimerasa específica del virus y otras cuantas proteínas. La RNA polimerasa específica del fago se encarga entonces de los principales procesos de transcripción del fago. Esta RNA polimerasa T7 usa sólo promotores específicos del fago que están distribuidos por las regiones del centro-izquierda y del centro del genoma (*véase* Figura 16.6). La RNA polimerasa T7 es muy específica para estos promotores (cuya secuencia no está relacionada con la de los promotores típicos de *Escherichia coli*) y es, además, una enzima extraordinariamente efectiva. (La ingeniería genética aprovecha esto para modelar genes que pueden ser expresados fácilmente; *véase* Sección 31.4.) Adviértase que esta situación es diferente a la del fago T4, el cual usa la polimerasa RNA del hospedador y la RNA polimerasa modificada durante toda la infección (*véase* Sección 9.9).

La replicación del DNA del T7 comienza en un único origen de replicación (indicado en la Figura 16.6) y continúa luego *bidireccionalmente* a partir de ese origen (Figura 16.7). Al microscopio electrónico se pueden reconocer moléculas de DNA del T7 en replicación por las estructuras características que forma. Debido a que el origen de replicación está próximo al extremo izquierdo, con frecuencia se ven moléculas en forma de Y o, en fases de replicación más temprana, con forma de burbuja (Figura 16.7). A diferencia de la situación que describimos para el ϕX174, la replicación del DNA del T7 requiere la participación de varias proteínas que están codificadas por el virus (*véase* Sección 16.2).

Una característica estructural del DNA del T7 que es importante en su replicación es que existe una *repetición terminal directa* de 160 pares de bases en los extremos de la molécula. Para replicar el DNA de las proximidades del extremo 5′, se tienen que eliminar las moléculas de RNA cebador antes de que acabe la replicación. Queda, por consiguiente, una porción del DNA del T7 no replicada en el extremo 5′ de cada cadena (*véase* parte inferior de la Figura 16.7*a*). Como se discutió en la Sección 7.7, los elementos genéticos constituidos por DNA lineal tienen una amplia variedad de estrategias para resolver este problema en su replicación. La estrategia de T7 es similar a la de T4 e involucra a las secuencias terminales repetidas (*véase* Sección 9.9). Los segmentos unicatenarios ~~en~~ 3′ de dos moléculas distintas de DNA, por ser complementarios, pueden aparearse formando una molécula de DNA que será dos veces más larga que el DNA original del T7 (Figura 16.7*b*). Las porciones no replicadas de esta estructura bimolecular en tándem pueden así completarse me-



Origen de replicación
5′
3′
3′
5′
5′
3′
3′
Forma en "bucle"
5′
5′
Forma en "Y"
3′
3′
5′
5′
3′
Cadenas complejas
(a)
Actúa la DNA ligasa
G A B C D E F G
G′ A′ B′ C′ D′ E′ F′ G′
Apareamiento de repeticiones terminales no replicadas
G A B C D E F G
G′ A′ B′ C′ D′ E′ F′ G′
Unión de moléculas nuevas y viejas por la DNA ligasa, formando un concatémero
(b)
B C D E F G A B C D E F G A B C D E
G′ A′ B′ C′ D′ E′ F′ G′ A′
Endo-nucleasa
DNA polimerasa
G A B C D E F
A′ B′ C′ D′ E′ F′ G′
DNA polimerasa
G A B C D E F G
G′ A′ B′ C′ D′ E′ F′ G′
Una endonucleasa (flechas) hace cortes unicatenarios
La DNA polimerasa completa los cortes unicatenarios
Molécula madura de T7, con repeticiones terminales
(c)

Figura 16.7 Replicación del genoma de DNA bicatenario y lineal del bacteriófago T7. (a) Replicación bidireccional del DNA que origina formas en «bucle» y en «Y». (b) Formación de concatémeros mediante unión de moléculas de DNA por los extremos terminales no replicados. La designación de los genes es arbitraria. (c) Producción de moléculas maduras de DNA vírico a partir de concatémeros de T7 por acción de una endonucleasa. Izquierda: la enzima produce cortes unicatenarios de secuencias específicas (flechas); la polimerasa DNA completa los extremos unicatenarios; derecha: molécula madura de T7, con repeticiones terminales. Compárese la Figura 16.7*c* con la Figura 9.13.

diante la acción de la DNA polimerasa y la DNA ligasa, originando una *bimolécula lineal* llamada un *concatémero*. Por replicación continuada y recombinación se puede llegar a la formación de concatémeros de considerable longitud, pero al final una endonucleasa codificada por el fago corta cada concatémero en un lugar específico, dando como resultado la formación de moléculas lineales del tamaño de las del virus, con repeticiones terminales (Figura 16.7*c*). Debido a que T7 (al igual que lambda, pero a diferencia de T4) corta el DNA que se va a empaquetar en secuencias específicas, la secuencia que empaqueta es siempre la misma. Hay que recordar que T4 emplea un mecanismo de corte destinado a completar la cabeza, lo cual indica que su DNA además de redundante en las terminaciones también permuta circularmente (*véase* Sección 9.9).

✓ 16.4 Revisión de conceptos

El genoma de DNA bicatenario del bacteriófago T7 siempre penetra en la célula hospedadora en la misma orientación. Una RNA polimerasa codificada por el virus transcribe los genes tardíos. La estrategia replicativa del genoma lineal de T7 incluye repeticiones terminales y recombinación.

- ✓ ¿Qué significado tiene el hecho de que el genoma de T7 penetre en la célula en una única orientación?
- ✓ ¿Qué se entiende por *repeticiones terminales?*

16.5 Bacteriófagos con DNA bicatenario: un virus transponible

Uno de los bacteriófagos más interesantes es el denominado **Mu**. Como el lambda, este virus es atemperado pero tiene la propiedad poco común de replicarse como un elemento transponible (*véase* Sección 7.4 y Capítulo 10.11). Su denominación deriva de que es un fago *mutador*, induciendo mutaciones en el genoma del hospedador en que se integra. Esta propiedad mutagénica de Mu se debe a que el genoma del virus se inserta en el medio de genes del hospedador, inactivando estos genes (y por tanto, que el hospedador infectado con Mu se comporte como un mutante). Mu es un fago muy útil porque se puede usar para generar de modo sencillo una gran variedad de mutantes bacterianos. Además, como se comentará en el Capítulo 10, Mu se puede utilizar en ingeniería genética.

Los elementos transponibles son secuencias de DNA que tienen la capacidad de moverse de un sitio a otro como elementos discretos. Se encuentran tanto en procariotas como en eucariotas y tienen un papel importante en la variación genética (*véase* Sección 10.11 para una discusión detallada de la transposición). Mu es un elemento transponible muy grande pero muy eficiente. Replica su DNA por transposición.

Estructura y mapa genético de Mu

Estructuralmente, el bacteriófago Mu es un virus grande con DNA bicatenario, una cabeza icosaédrica, una cola helicoidal y seis fibras en la cola (Figura 16.8). El mapa genético de Mu se muestra en la Figura 16.9*a*. Se puede observar que la mayor parte de la información genética tiene que ver con la síntesis de la cabeza y de la cola, pero que en cada extremo hay genes importantes relacionados con la replicación y la inmunidad. La molécula de DNA dentro del virión tiene una longitud aproximada de 39.000 pares de bases (39kb), pero sólo 37,2 kb representan el genoma real de Mu. Esto se debe a que ambos extremos de esta molécula de DNA contienen DNA del hospedador. En el extremo izquierdo del DNA de Mu hay 50-150 pares de bases del hospedador, y en el derecho 1-2 kb del mismo origen. Estas secuencias del hospedador no son únicas y representan DNA adyacente a la localización donde Mu estuvo insertado en el genoma de su anterior hospedador. Durante la formación de una partícula de fago, Mu se corta del hospedador una longitud de DNA (que contiene el genoma del fago Mu) lo suficientemente larga como para llenar la cabeza del fago, comenzando por el extremo izquierdo. El DNA se enrolla hasta que la cabeza está llena, pero el sitio de corte en el extremo derecho varía de una partícula de fago a otra. Por esta razón, como se muestra en el mapa genético, existe una secuencia variable de DNA celular en el extremo derecho (a la derecha del sitio *attR*) que representa el DNA del *hospedador* empaquetado en la cabeza del

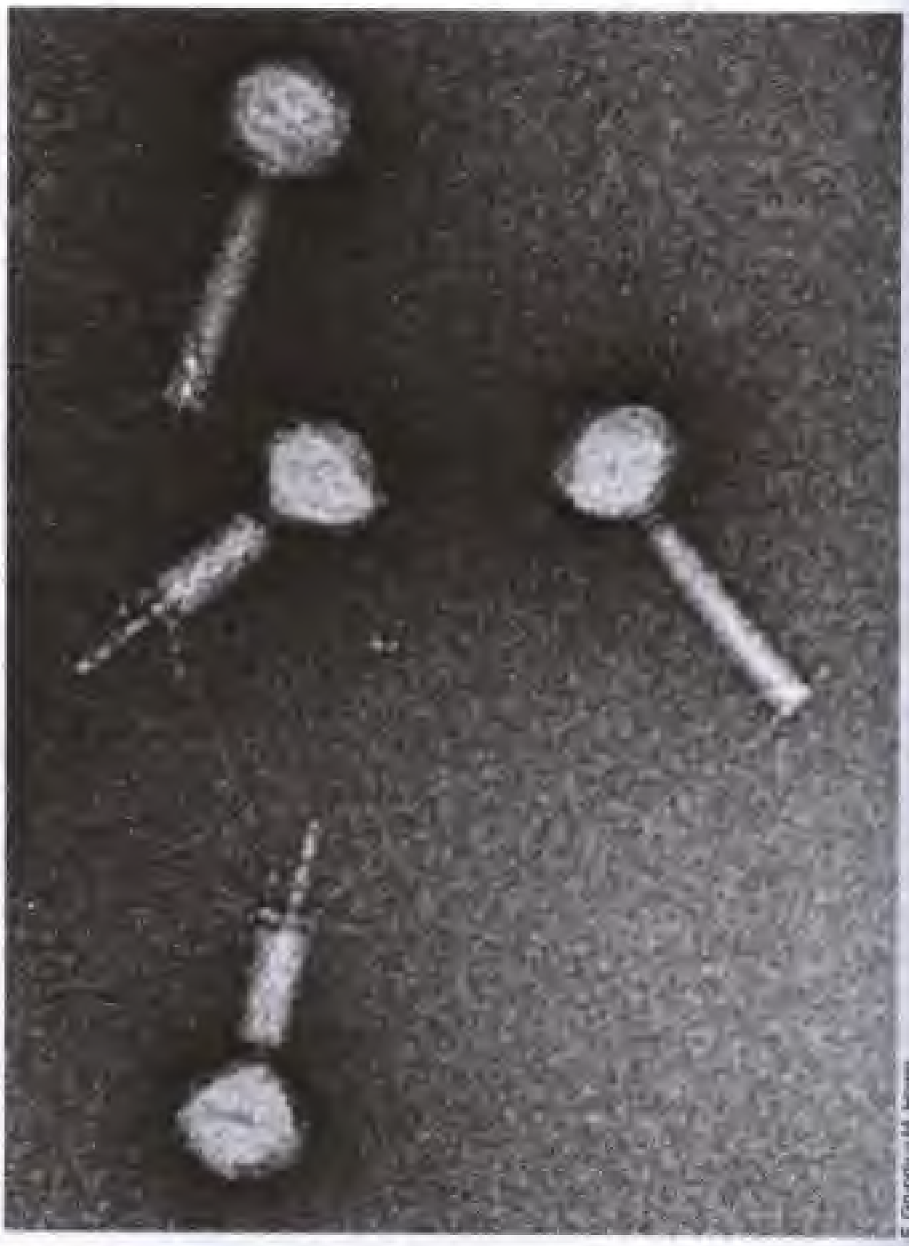

E. Grundy y M. Howe

Figura 16.8 Micrografía electrónica de viriones del bacteriófago Mu, el fago mutador.

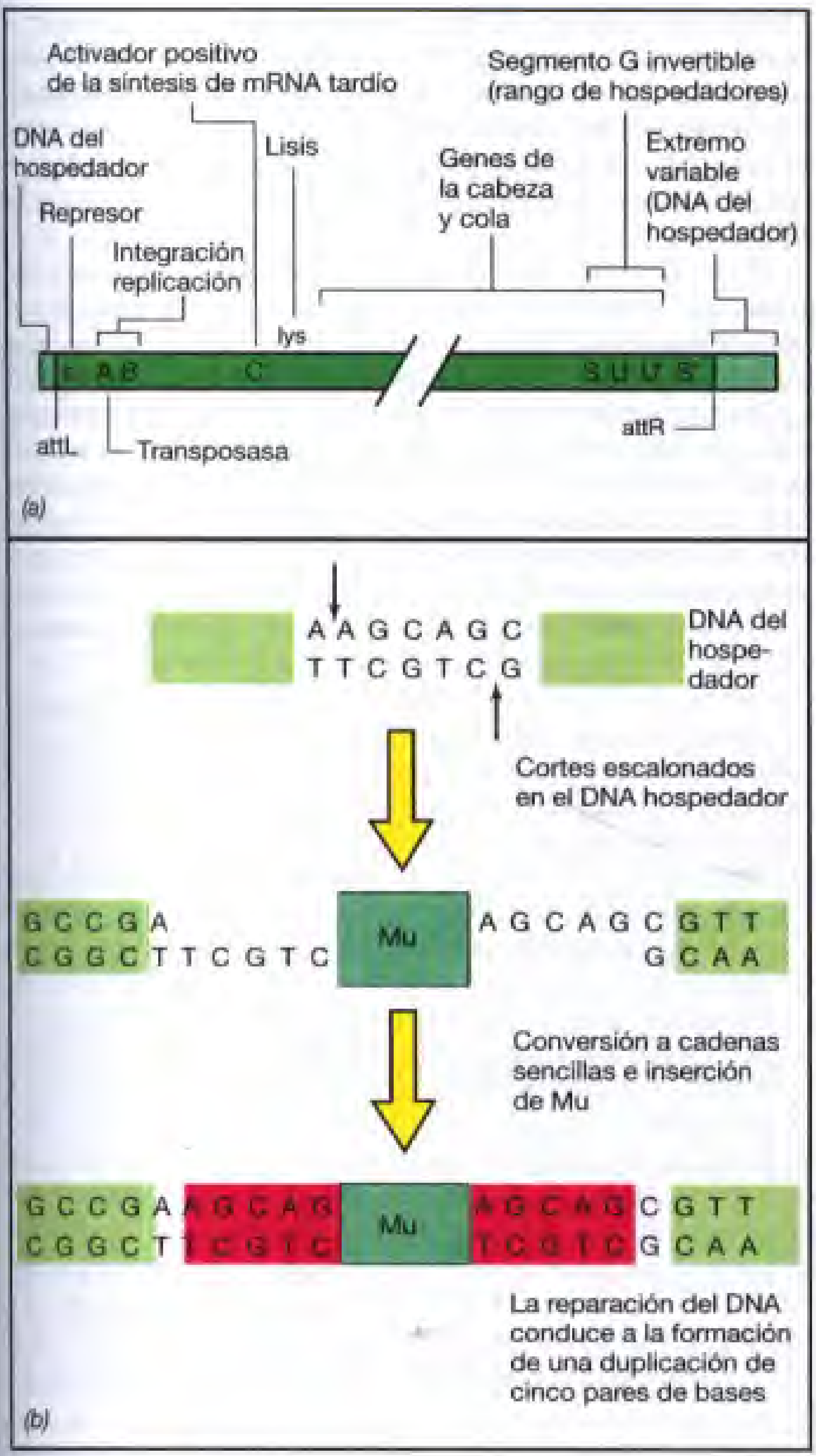

Activador positivo
de la síntesis de mRNA tardío
Segmento G invertible
(rango de hospedadores)
DNA del
hospedador
Lisis
Genes de
la cabeza
y cola
Extremo
variable
(DNA del
hospedador)
Represor
Integración
replicación
lys
c A B
C
S U U' S'
attL
Transposasa
attR
(a)
A A G C A G C
T T C G T C G
DNA del
hospe-
dador
Cortes escalonados
en el DNA hospedador
G C C G A
C G G C T T C G T C
Mu
A G C A G C G T T
G C A A
Conversión a cadenas
sencillas e inserción
de Mu
G C C G A A G C A G
C G G C T T C G T C
Mu
A G C A G C G T T
T C G T C G C A A
La reparación del DNA
conduce a la formación
de una duplicación de
cinco pares de bases
(b)

Figura 16.9 Bacteriófago Mu. (a) Mapa genético de Mu. Véase el texto para detalles. (Para mayor complicación, hay dos Gs, el gen G y el segmento invertible G, que son diferentes. También hay un gen c minúscula, que codifica un represor, y un gen C mayúscula, que codifica una proteína activadora.) La región que codifica los genes de la cabeza y de la cola no está representada a escala. (b) Integración de Mu en el DNA del hospedador, mostrando la generación de una duplicación de cinco pares de bases en el DNA receptor.

fago. Cada virión formado por una célula infectada tendrá una cantidad diferente de este DNA y su secuencia de bases será diferente.

Hay que advertir que los bacteriófagos tratados hasta el momento tienen genomas DNA bicatenarios, T4 (*véase* Sección 9.9), T7 (*véase* Sección 16.4), lambda (*véase* Sección 9.10), y Mu, tienen todos de genomas lineales pero utilizan tres estrategias muy diferentes para replicar las terminaciones (*véase* Sección 7.7). T4 y T7 poseen repeticiones terminales y se valen de la recombinación para formar concatémeros; lambda circulariza su genoma después de la infección, y Mu siempre se replica como parte de una molécula DNA mayor.

Como se indica en el mapa genético (Figura 16.9), hay un segmento específico del genoma de Mu llamado G (distinto al gen G) que se puede *invertir*, pudiendo estar presente en la orientación G$^+$ o en la orientación invertida G$^-$. La orientación de este segmento determina el tipo de fibras de la cola que son producidas para el fago. Como la adsorción a la célula hospedadora está controlada por la especificidad de las fibras de la cola, el rango de hospedadores de Mu queda determinado por la orientación que presente este segmento invertible en el fago. Si el segmento G está en una orientación designada G$^+$, el fago podrá infectar la cepa K12 de *Escherichia coli*. Si el segmento G está en la orientación G$^-$, entonces el fago infectará la cepa C de *E. coli* y otras especies de bacterias entéricas. Las dos proteínas de las fibras de la cola están codificadas en cadenas opuestas dentro de este pequeño segmento G. A la izquierda del segmento G, hay un promotor que dirige la transcripción del segmento. En la orientación G$^+$, el promotor que dirige la transcripción de S y U es activo, mientras que en la orientación G$^-$ un promotor diferente dirige la transcripción de los genes S'y U'en la cadena opuesta. La existencia de regulación por reordenamiento de secuencias de DNA se conoce en otros virus, así como en células procariotas y eucariotas.

Replicación de Mu

Cuando Mu infecta una célula, el DNA que se inyecta está protegido del sistema de restricción del hospedador por un sistema de modificación mediante el cual un 15% de los residuos de adenina están acetoamidados. A diferencia de lambda, la integración de DNA de Mu en el genoma del hospedador es esencial tanto para el ciclo lítico como para el lisogénico. La integración requiere la actividad del producto del gen A, que es una transposasa. En el sitio donde se integra el DNA de Mu ocurre una duplicación de cinco pares de bases. Como se muestra en la Figura 16.9*b*, esta duplicación en el DNA del hospedador se origina porque se hacen cortes escalonados donde se inserta Mu, y los segmentos unicatenarios resultantes se convierten a forma bicatenaria como parte del proceso de integración. Esta duplicación de fragmentos cortos del DNA del hospedador es típica de elementos transponibles de inserción (*véase* Sección 10.11).

El ciclo lítico de Mu puede ocurrir tras la infección inicial, si no se forma el represor de Mu (que es el producto del gen *c*), o por inducción de una célula lisogénica. En ambos casos, la replicación del DNA de Mu implica la transposición repetida de Mu a múltiples sitios del genoma del hospedador. Al principio sólo ocurre la transcripción de los genes tempranos de Mu, pero después de que se expresa la proteína del gen C, que activa la síntesis del RNA tardío, tiene lugar la síntesis de las proteínas de la cabeza y de la cola de Mu. Al final se expresan las funciones líticas y se liberan las partículas de nuevos fagos maduros.

✓ 16.5 Revisión de conceptos

Mu es un bacteriófago atenuado a la vez que un elemento transponible. Tanto en su vía lítica como lisogénica, su genoma se integra en el cromosoma del hospedador. Incluso en la vía metabólica lítica, su genoma se replica como parte de una molécula DNA mayor. El genoma se empaqueta en el virión de tal manera que quedan secuencias cortas del DNA del hospedador en cada extremo.

- ✓ ¿Qué es un elemento transponible?
- ✓ ¿Qué mecanismo emplea Mu para asegurar que los extremos de su genoma lineal se han replicado por completo?

II VIRUS DE EUCARIOTAS

Las diferencias entre células procariotas y eucariotas imponen algunas restricciones a los virus que las infectan. Por ejemplo, en los procariotas los procesos de transcripción y traducción pueden acoplarse. En eucariotas, por el contrario, la transcripción (y la replicación de DNA) tiene lugar en el núcleo y la traducción en el citoplasma. Algunas de estas características se han discutido en el Capítulo 9, dentro de una visión general de los virus animales (*véase* Sección 9.11). En ese capítulo, sin embargo, se ha tratado muy brevemente algunos tipos de virus y sólo los que infectan animales. Nuestro interés en los virus de animales también llamadas virus animales deriva en parte de su papel en las enfermedades humanas. Vamos a tratar entonces más virus de este tipo en lo que queda de capítulo. Sin embargo, no todos los eucariotas son animales y en la siguiente sección se ofrece una breve discusión de los virus de plantas o virus vegetales.

16.6 Virus de plantas

Las paredes de las células vegetales son extremadamente gruesas y fuertes. Algunos virus de plantas las infectan y, en las plantas multicelulares, se diseminan a partir de la célula infectada alcanzando las células vecinas. La gran mayoría de virus de plantas que se conocen son RNA de cadena positiva y se ha postulado que estos pequeños genomas facilitan la transferencia de célula a célula dentro de la planta.

Virus del mosaico del tabaco

En 1892, Dmitri Ivanowsky, un científico ruso, mostró que el agente causante de la enfermedad del mosaico del tabaco era capaz de atravesar los filtros que retenían las bacterias. En 1898, el microbiólogo holandés Martinus Beijerick (*véase* Sección 1.6) mostró que no sólo era filtrable, sino que además tenía muchas de las propiedades de un organismo vivo. Este agente, el primer virus reconocido, era el del mosaico del tabaco (TMV). El TMV tiene un virión de simetría helicoidal (*véase* Sección 9.2) y contiene 2130 copias de una proteína capsular y una sola copia del genoma RNA de cadena positiva (*véase* Figura 9.2). Fue con ayuda del TMV como se mostró por primera vez que el RNA podía ser el material genético, de la misma forma que el DNA lo era en otros virus y células. El TMV sigue siendo un problema grave en agricultura, ya que infecta las plantas de tomate y de tabaco (aunque se dispone de líneas de plantas resistentes). Para infectar una planta por TMV hay que dañar la pared de algunas células vegetales, a través de la cual puede penetrar el virión. La decapsidación se produce dentro de la célula.

El genoma de TMV contiene 6395 nucleótidos; en la Figura 16.10 se muestra un mapa del genoma. Al igual que el bacteriófago MS2 (*véase* Sección 16.1), el TMV codifica cuatro proteínas. El genoma tiene un extremo 5′ (*véase* Sección 7.12) que puede ser traducido, y un extremo 3′ doblado en una estructura parecida al tRNA. Sin embargo, los eucariotas no pueden traducir mRNA policistrónico (*véase* Sección 7.11), de manera que la expresión de todos estos genes es algo más complicada que en el caso de MS2. El primer gen codifica una proteína, MTH, con dos dominios funcionales: una es una metiltransferasa que actúa en el encabezamiento del RNA («capping») y la otra una RNA helicasa. El gen siguiente codifica una polimerasa RNA dependiente de RNA que el virus tiene que sintetizar para replicar una copia de la cadena negativa a partir de la cual puede ya realizar más copias del RNA genómico. Esta proteína sólo se sintetiza como parte de una poliproteína que incluye los dominios MTH, y sólo cuando un ribosoma lee a través del codón de parada en el extremo del gen MTH. Como esto es algo que no ocurre frecuentemente, esta proteína más larga se fabrica en pequeñas cantidades. Los dos genes restantes codifican la proteína en movimiento (MP) y la proteína de la cápsida (CP). Como los ribosomas eucariotas no pueden usar mRNA policistrónico, estos dos genes no se traducen directamente a partir del RNA genómico. En lugar de eso, se fabrican dos mRNA subgenómicos a partir del RNA de cadena negativa, y cada uno de ellos se traduce, dando una de esas proteínas. Al igual que las proteínas de la cubierta de otros virus, la de TMV es esencial para la formación del virión. El virión es esencial para infectar nuevas plantas. Sin embargo, es la proteína de movimiento la que permite que TMV infecte las células vecinas en una planta ya infectada.

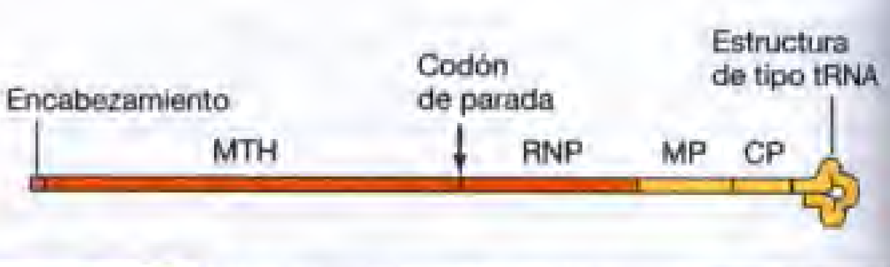


Figura 16.10 Mapa genético del virus del mosaico del tabaco. El genoma es una cadena RNA positiva que tiene un encabezamiento («cap») en su extremo 5′ y una estructura similar al tRNA (representada mayor que a escala) en su extremo 3′. El gen MTH codifica una proteína con actividad de metiltransferasa y de RNA helicasa. El gen RNP codifica una RNA polimerasa dependiente de RNA que solamente es traducida como una poliproteína por ribosomas que leen a través del codón de parada («stop») que sigue al gen MTH. El gen MP codifica una proteína de movimiento, y el gen CP codifica la proteína de la cubierta. Estas dos proteínas son traducidas por los RNA subgénicos que son sintetizados usando la cadena RNA negativa después de ser producida ésta durante la infección.

Las células de plantas tienen estructuras denominadas *plasmodesmos*, que son conexiones intercelulares que expanden la pared celular. Los plasmodesmos poseen canales muy estrechos, tanto que ningún virión TMV ni RNA libre puede atravesar fácilmente tales aberturas. La MP se une al nuevo RNA genómico y forma complejos extremadamente delgados (2,5 nm), que son los que se desplazan a través de los plasmodesmos.

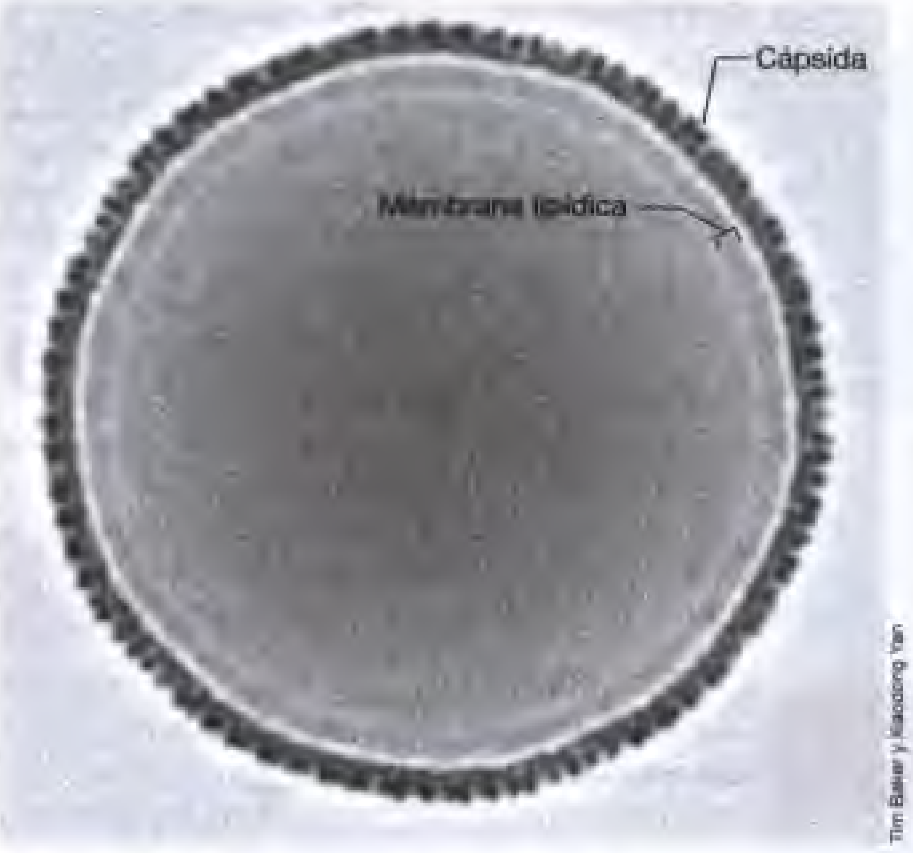
Tal como se ha indicado, se conocen muchos virus de plantas con RNA de cadena positiva, y hay también virus RNA de cadena positiva de *Bacteria* (*véase* Sección 16.1) y de animales (*véase* Sección 16.7). El análisis de las secuencias indica que algunos de estos virus están emparentados, y que todas sus polimerasas RNA dependientes de RNA están relacionadas. Sin embargo, presentan ligeras diferencias en sus estrategias de replicación que, a menudo, tienen que ver con las diferencias existentes entre las células hospedadoras.

Virus de *Chlorella*

A menudo pensamos en los virus de plantas como aquellos que infectan los productos de la agricultura y también otras grandes plantas multicelulares. Existe, sin embargo, una enorme cantidad de plantas unicelulares, ninguna de ellas de más amplia distribución que las algas unicelulares (*véase* Sección 14.11). Entre ellas se encuentra el alga verde *Chlorella*. La mayoría de especies de *Chlorella* son de vida libre, pero algunas algas parecidas son endosimbiontes de animales de aguas dulces o marinos, por ejemplo, protozoos como *Paramecium* (*véase* Sección 14.8). Algunos de éstos, sin embargo, se pueden cultivar en el laboratorio con independencia del organismo en el cual suele crecer. Se conocen virus que infectan esas algas «exsimbióticas» parecidas a *Chlorella*, pero que no pueden infectar las formas endosimbióticas. Se suelen denominar virus de *Chlorella* de los cuales el mejor estudiado es el virus *Paramecium bursaria* clorela 1 (PBCV-1).

Estos virus poseen viriones grandes icosaédricos (*véase* Figura 16.11) y genomas DNA bicatenarios. Los viriones tienen un componente lipídico que es esencial para la infectividad pero que está dentro de la cápsida, con lo cual, el virión no tiene cubierta. El genoma de los virus de *Chlorella* son extremadamente grandes, todos superan los 300 kb (para una comparación con otros virus, *véase* la Tabla 9.1). En muchos casos, el DNA está también muy metilado, hasta un 45% de la citosina está como 5-metilcitosina y más del 20% de la adenina está como 6-metiladenina. Sin embargo, en PBCV-1, cada una de estas bases modificadas representan menos del 2% de las formas no modificadas. El genoma de PBCV-1, que se ha secuenciado por completo, tiene 330.742 bp y codifica más de 370 proteínas diferentes y 10 RNAs de transferencia. La estructura en horquilla del apareamiento de bases en las terminaciones del genoma aparece de forma incompleta (*véase* Figura 7.8) de manera muy similar a lo que se encuentra en los poxvirus (*véase* Sección 16.12).

Estos virus penetran de forma parecida a como lo hacen los bacteriófagos. Se unen específicamente a la pared celular de su hospedador, y después al menos cinco enzimas diferentes que lleva el virión digieren la pared celular en el punto de contacto. El DNA vírico es liberado en la célula dejando tras de sí la cápsida vacía.



Tim Baker y Xiaodong Yan

Figura 16.11 Sección ecuatorial de la reconstrucción de los mapas de densidad del virus PBCV-1 de *Chlorella* (alga verde; *véase* Sección 14.11). Debajo de la estructura de la cápsida, se observa una membrana bicapa lipídica. El virión tiene un diámetro de aproximadamente 170 nm.

Como en el caso de la mayoría de virus DNA bicatenario de eucariotas, el DNA de PBCV-1 se replica en el núcleo, y el RNA también se sintetiza allí. PBCV-1 codifica algunas enzimas que intervienen en la replicación del DNA, entre ellas una DNA polimerasa pero, aunque codifica algunos factores de transcripción, no codifica su propia RNA polimerasa o alguna de las subunidades (*véase* Sección 7.8). Algunos de los genes de PBCV-1 contienen intrones que tienen que ser procesados (*véase* Sección 7.12). El mRNA inicial, pero no el tardío, tiene extremos poli-A. Al igual que el bacteriófago T4, PBCV-1 codifica varios tRNAs. A diferencia de cualquier otro tipo de virus conocido (pero presumiblemente igual que otros virus de *Chlorella*), PBCV-1 codifica un factor de elongación que se usa en la traducción.

Aunque en la actualidad los hospedadores conocidos de estos virus son solamente exsimbiontes aislados en el laboratorio, los virus por sí mismos se encuentran bastante distribuidos en la naturaleza. En consecuencia, debe de haber muchos hospedadores naturales. Además, los virus de *Chlorella* están relacionados con otros que infectan algas. Todos estos últimos poseen genomas de DNA bicatenario muy grandes, pero algunos de ellos son circulares.

Todavía queda otro factor destacable en los virus de *Chlorella*, y es que codifican varios sistemas enzimáticos de restricción y modificación (*véanse* Secciones 9.6 y 10.12). De hecho, son la única fuente de enzimas de restricción fuera de los procariotas.

✓ 16.6 Revisión de conceptos

La mayoría de los virus de plantas tienen genomas RNA de cadena positiva. Un ejemplo de este tipo de virus es el del mosaico del tabaco (TMV), el primer virus que se descubrió. Aunque estos virus penetran en la célula a través de roturas en la pared de la célula vegetal, sus genomas se pueden desplazar desde la célula infectada a las células vecinas por medio de conexiones intercelulares que expanden las paredes celulares. Se conocen otros tipos de virus vegetales, entre ellos los virus de *Chlorella*, que poseen genomas de DNA bicatenario de gran tamaño.

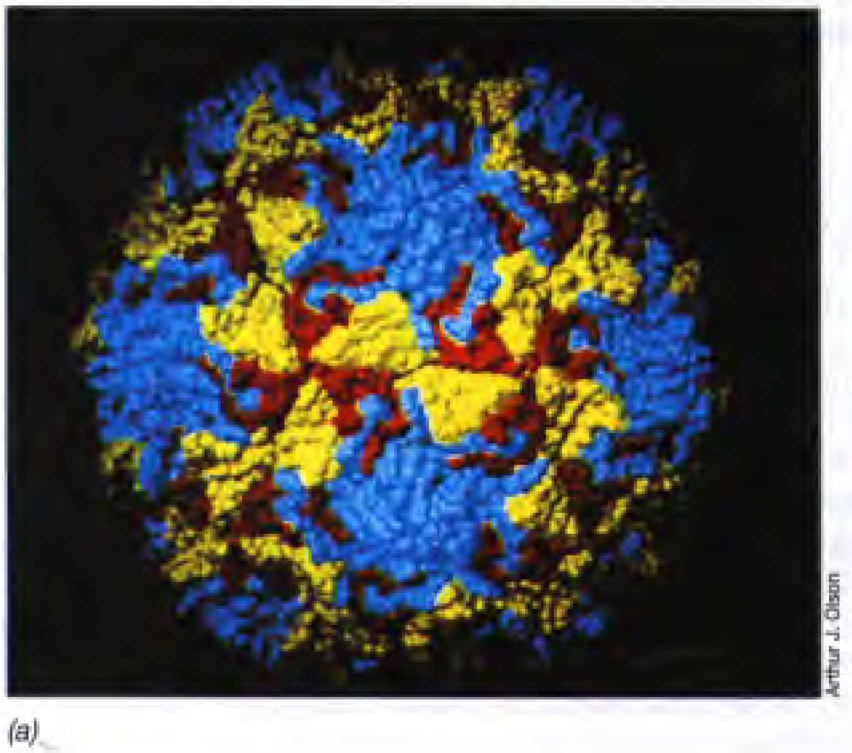
- ✓ La mayoría de virus RNA de plantas codifican una *proteína de movimiento*. ¿Cuál es su papel en la infección?
- ✓ Aunque el genoma del TMV se usa como RNA mensajero, no toda la proteína codificada por el virus se puede traducir. Explíquese la razón.

16.7 Virus de animales con RNA de cadena positiva

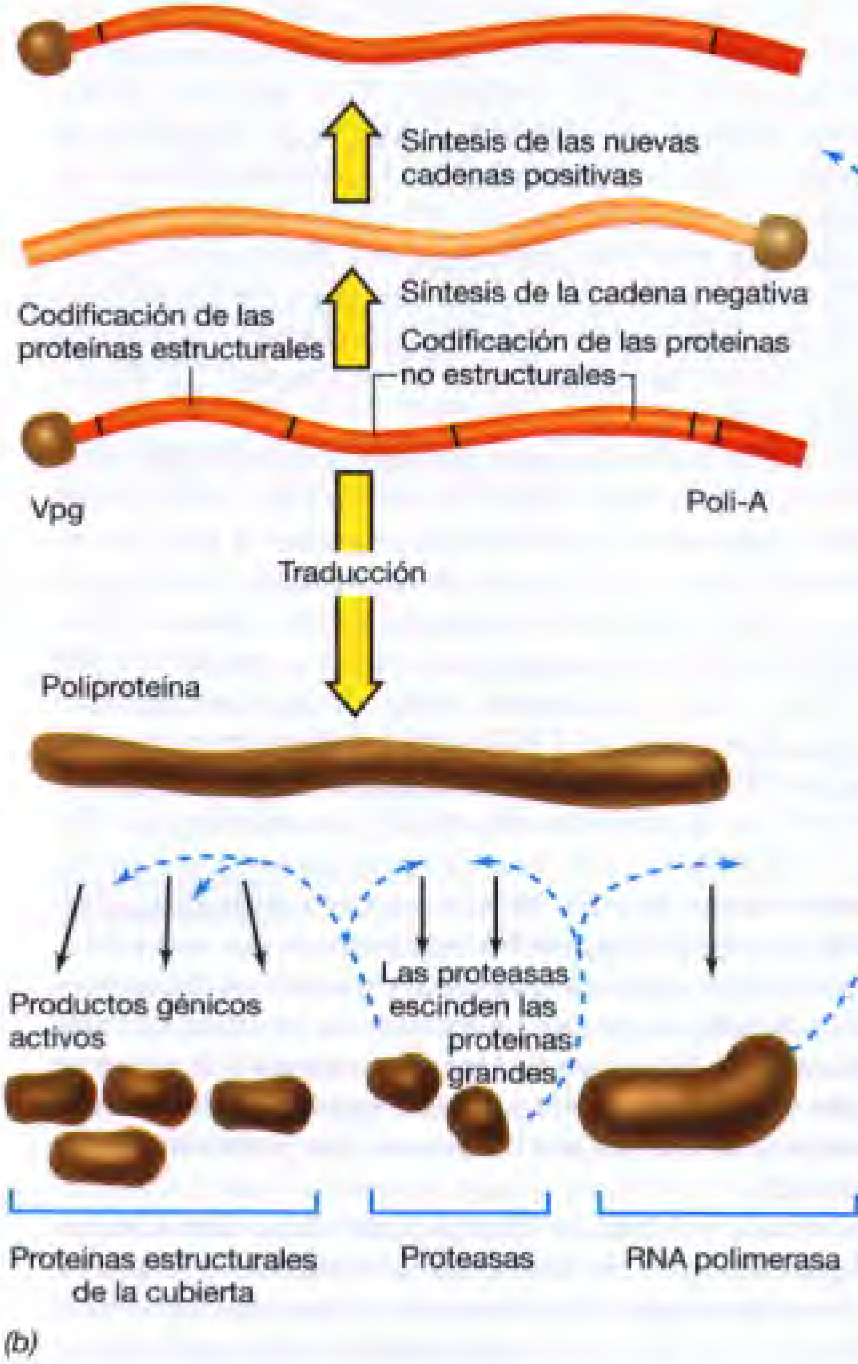
De la misma forma que existen diversos bacteriófagos y virus de plantas con RNA de cadena positiva, también se conocen muchas clases diferentes de virus de animales con este tipo de genoma. Un grupo importante de virus de animales RNA de cadena positiva es el de la *familia picornavirus*, que tienen virus que causan infecciones en humanos tan importantes como los poliovirus, los rhinovirus, que provocan el resfriado común, y el *virus de la hepatitis A*. El primer virus de animales que se descubrió fue el de la fiebre aftosa o glosopeda, que es un picornavirus. Este nombre se debe a su diminuto tamaño (30 nm de diámetro; *pico* significa «pequeño»), y contienen RNA unicatenario. La partícula vírica tiene una estructura simple icosaédrica, con 60 unidades morfológicas por virión, cada una de las cuales se compone de cuatro proteínas distintas (Figura 16.12*a*).

En los poliovirus, el RNA es una molécula lineal de unas 7500 bases de longitud (*véase* Tabla 9.1). En el extremo 5′ del RNA vírico se encuentra la proteína *VPg*, que está unida covalentemente al RNA. En el extremo 3′ hay una porción de poli-A.

La Figura 16.12*b* muestra un esquema global del modo de multiplicación de los poliovirus. El RNA del virus actúa directamente como mensajero. Esto resulta notable puesto que el RNA no presenta encabezamiento («cap»)


Arthur J. Olson

(a)


Síntesis de las nuevas cadenas positivas
Codificación de las proteínas estructurales
Síntesis de la cadena negativa
Codificación de las proteínas no estructurales
Vpg
Poli-A
Traducción
Poliproteína
Productos génicos activos
Las proteasas escinden las proteínas grandes
Proteínas estructurales de la cubierta
Proteasas
RNA polimerasa

(b)

Figura 16.12 (a) Partícula de poliovirus. Modelo diseñado por computadora basado en el análisis de cristales de virus por difracción de electrones. Las distintas proteínas estructurales se muestran en distintos colores. (b) Reproducción del poliovirus. El RNA unicatenario del virus se traduce directamente como RNA mensajero, produciendo una gran molécula proteica. Esta proteína se escinde, originando las proteínas víricas activas; éstas son, entre otras, las proteínas estructurales de la cubierta y la polimerasa RNA que replica el RNA del poliovirus. A continuación, tiene lugar el ensamblaje del virus completo a partir de las proteínas de la cubierta y del RNA.

(*véase* Sección 7.12). El extremo 5' del RNA de los poliovirus presenta una larga secuencia que se puede replegar sobre sí misma, formando varios bucles con tallo (*véase* Sección 7.10) que permiten la unión del ribosoma eucariótico. El RNA vírico es monocistrónico, pero codifica todas las proteínas del virus formando una única *poliproteína* que es posteriormente escindida en las proteínas individuales. Todo el proceso replicativo ocurre en el citoplasma.

Al iniciarse la infección, el virus se fija a un receptor específico sobre la superficie de una célula sensible y penetra en la célula. Una vez dentro, se decapsida y el RNA libre se asocia con los ribosomas. Entonces, el RNA vírico se traduce comenzando por un único punto de iniciación y se forma la poliproteína grande mencionada anteriormente. Esta proteína gigante (de alrededor de 220 residuos de aminoácidos) sufre a continuación una autohidrólisis, generando unas 20 proteínas más pequeñas (incluyendo los intermediarios formados en las roturas), entre las que se encuentran las cuatro *proteínas estructurales* de la partícula vírica. La *proteína VPg* ligada al RNA, una RNA polimerasa responsable de la síntesis de cadenas con polaridad negativa, y al menos una *proteasa codificada por el virus* que lleva a cabo el proceso hidrolítico. Este proceso, llamado *rotura post-traduccional*, ocurre en muchos virus de animales, así como en el metabolismo normal de las células animales (*véase* el cuadro «Procesado de proteínas», en el Capítulo 8).

Replicación de los poliovirus

La replicación del RNA vírico comienza poco después de la infección y está catalizada por la RNA polimerasa dependiente de RNA (replicasa) que se forma en el proceso descrito en el párrafo anterior. Esta replicasa transcribe el RNA vírico, de sentido positivo, en una molécula complementaria de RNA de sentido negativo, la cual sirve luego como molde para la transcripción repetida que origina las cadenas positivas de la descendencia. Algunas de estas cadenas positivas pueden ser transcritas de nuevo a cadenas negativas, de modo que en la célula pueden llegar a estar presentes hasta 1000 cadenas de polaridad negativa. A continuación, a partir de estas cadenas se puede formar un millón de cadenas positivas. Las cadenas positivas y las negativas llegan a estar covalentemente unidas por la pequeña proteína VPg (que consta sólo de 22 aminoácidos), y que podría servir como cebador para la transcripción.

Cuando comienza la multiplicación del virus, se inhibe la síntesis de RNA y de proteína del hospedador. La síntesis de proteína resulta inhibida como consecuencia de la destrucción de una proteína del hospedador que se une al encabezamiento de los mRNAs y es requerida para su traducción (*véase* Sección 7.12).

En un tiempo, la polio fue una de las principales enfermedades infecciosas humanas, pero el desarrollo de una vacuna efectiva (*véase* Sección 22.11) consiguió un control completo de la enfermedad. La Organización Mundial para la Salud dispone de un programa de vacunación que trata de erradicarla, y diversos informes a finales del año 2000 corroboraron que su presencia estaba limitada a algunos países de África y al subcontinente indio.

✓ 16.7 Revisión de conceptos

En virus pequeños RNA, como el de la polio, el RNA vírico actúa directamente como RNA mensajero único, originando la producción de una larga poliproteína que se rompe enzimáticamente en varias proteínas pequeñas, necesarias para la replicación del ácido nucleico y el ensamblaje del virus.

- ✓ ¿Qué es un *encabezamiento* y cuál es su función normal?
- ✓ ¿Cómo puede el RNA de un poliovirus sintetizarse en el citoplasma mientras que el RNA del hospedador se sintetiza en el núcleo?

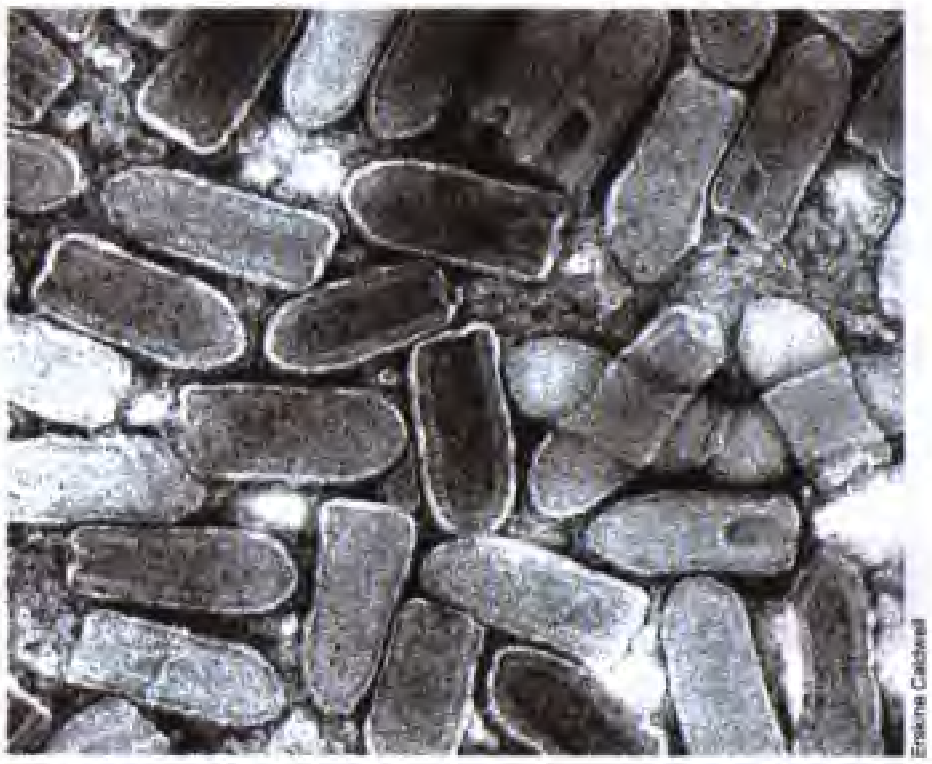
16.8 Virus de animales con RNA de cadena negativa

En algunos virus de animales con RNA, el ácido nucleico no sirve directamente como mensajero sino que es transcrito a una cadena complementaria que funciona como mRNA. Como se comentó en la Sección 9.7, se expresa convencionalmente como *positiva* la configuración del mRNA, de modo que si la cadena del RNA genómico es de complementariedad opuesta se designa como *negativa*. En consecuencia, este grupo de virus se denomina *virus con RNA de cadena negativa*, o de cadena *menos* y se encuentran en la Clase V de la Clasificación de Baltimore (*véase* Tabla 9.2). Consideramos aquí dos grupos de virus importantes: los rhabdovirus, que incluyen el virus de la rabia, y los ortomixovirus, que incluyen el virus de la gripe. El virus Ébola, que es un patógeno humano responsable de una nueva enfermedad infecciosa (*véase* Sección 25.10) es también un virus RNA de cadena negativa.

Rhabdovirus

Uno de los patógenos humanos más importantes es el virus de la rabia, que es RNA de cadena negativa, y causa dicha enfermedad en animales y en humanos (*véase* Sección 27.1). La denominación *rhabdovirus* deriva de *rhabdo*, que significa «bastón», en referencia a la forma de la partícula vírica. Otro rhabdovirus que ha sido ampliamente estudiado es el virus de la *estomatitis vesicular* (VSV) (Figura 16.13), que ocasiona esa enfermedad en vacas, cerdos, caballos y, algunas veces, en humanos. Muchos rhabdovirus, como el virus del enanismo amarillento de la patata, infectan tanto a insectos como a plantas y pueden causar graves problemas en la agricultura. (No se conocen bacteriófagos RNA de cadena negativa.)

Los rhabdovirus son virus con una extensa y compleja envoltura lipídica que rodea la nucleocápsida (Figura 16.13). En los rhabdovirus animales la partícula vírica tiene forma de bala, con 70 nm de diámetro y 175 nm de longitud. La nucleocápsida tiene simetría helicoidal y representa sólo una pequeña parte del peso de la partícula vírica completa (el RNA del virión representa el 2-3%). El virión contiene varias enzimas que son esenciales en el proceso infectivo. Una de ellas es una *RNA polimerasa RNA dependiente*. Como se comentó en la Sección 9.7, la presencia de RNA polimerasa resulta esencial, porque el genoma de estos virus tiene polaridad negativa y no puede actuar



Erskine Caldwell

Figura 16.13 Micrografía electrónica de un rabdovirus (virus de la estomatitis vesicular). El diámetro aproximado de una partícula es 65 nm.

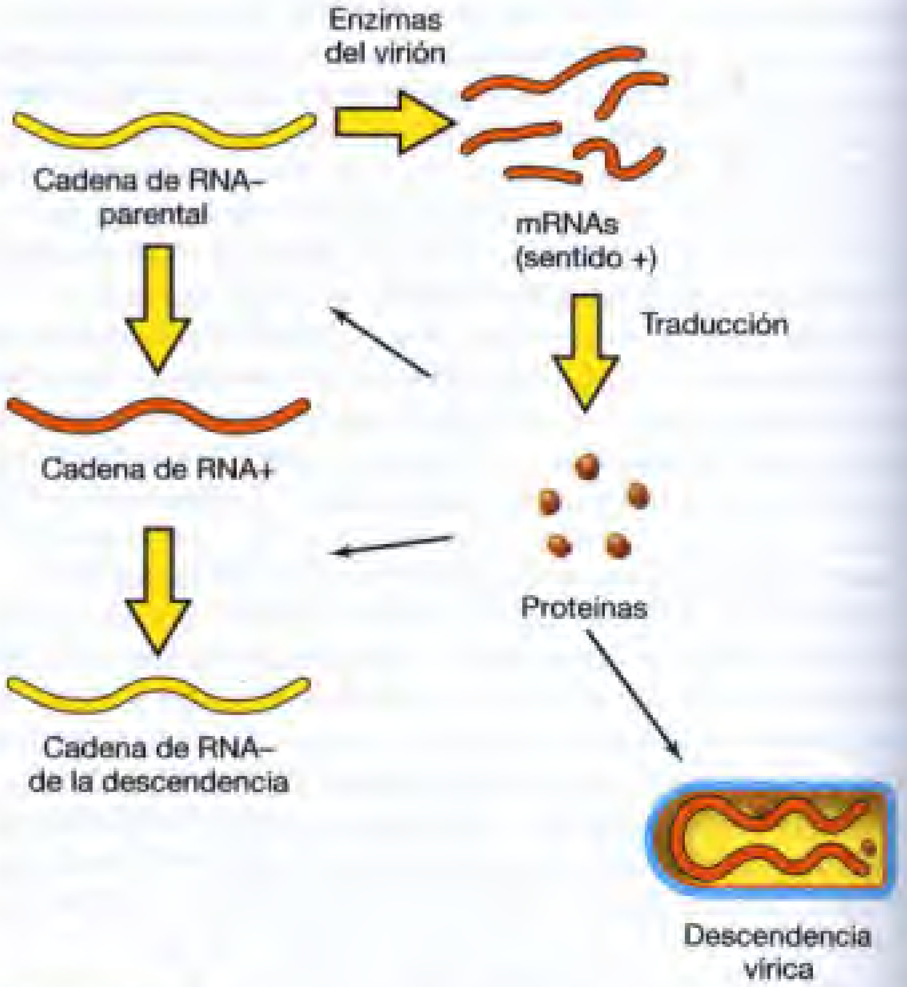


Figura 16.14 Proceso de multiplicación de un virus con RNA de cadena negativa.

como mensajero directamente sino que tiene que ser transcrito en una cadena complementaria positiva. En el hospedador no existen enzimas que puedan transcribir RNA a partir de RNA.

El RNA de los rhabdovirus se transcribe en el citoplasma celular en dos clases diferentes de RNA (Figura 16.14). El primer tipo de síntesis de RNA origina una serie de RNAs mensajeros a partir de los diversos genes víricos (el VSV tiene cinco). El segundo tipo origina una cadena positiva de RNA que es una *copia* del genoma vírico completo (el genoma del VSV tiene 11.162 nucleótidos de longitud). Estas largas cadenas de RNA sirven entonces de molde para la síntesis de las *cadenas negativas* de RNA, que servirán de genomas para la descendencia de viriones. Cada uno de los mRNA es monocistrónico, es decir, codifica una sola proteína. Una vez que se forma el mRNA correspondiente a la RNA polimerasa vírica en este proceso de transcripción primaria, comienza la síntesis de tal enzima, lo que lleva a la aparición de muchas *cadenas positivas* de RNA, tanto de moléculas de mensajeros como de moldes con la longitud del genoma vírico completo.

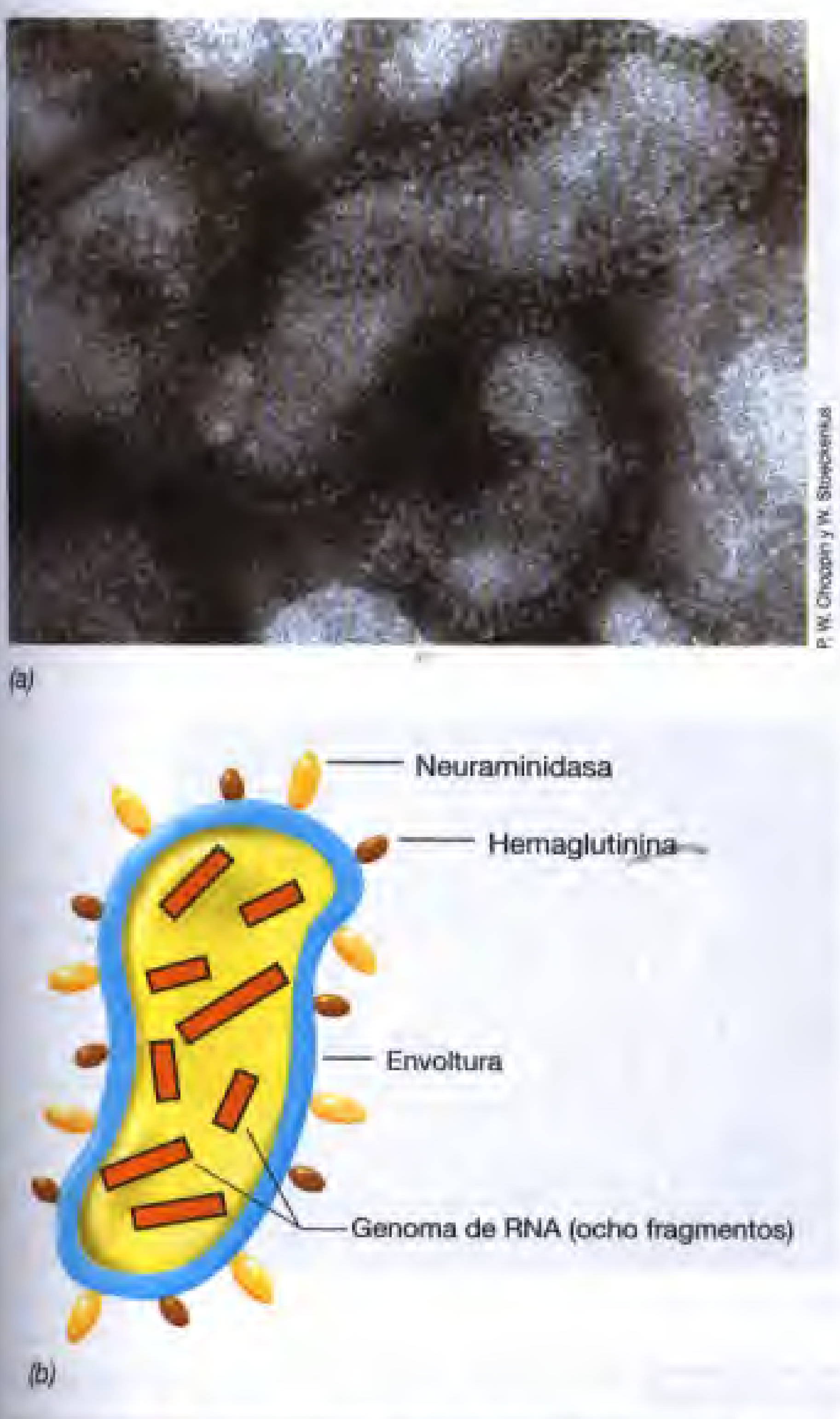
La traducción de los mRNA víricos origina la formación de las proteínas de la cubierta. El ensamblaje de un virus con envoltura es considerablemente más complejo que el de una partícula de un virus simple. Se forman dos clases de proteínas de la cubierta, las *proteínas de la nucleocápsida* y las *proteínas de la envoltura*. La nucleocápsida se forma primero, por asociación de las moléculas de proteína alrededor del RNA vírico.

Las *proteínas de la envoltura*, que poseen una secuencia-señal en sus extremos amino-terminales (*véase* Sección 7.16) se sintetizan en complejos ribosómicos y se asocian con membranas. Cuando estas proteínas se están sintetizando, se añaden restos de azúcares para formar *glicoproteínas*. Éstas se transportan hasta la membrana citoplásmica (con pérdida de la secuencia-señal), donde reemplazan a las proteínas de membrana del hospedador. Las nucleocápsidas emigran luego a las áreas de la membrana citoplásmica donde se localizan estas glicoproteínas específicas del virus, que son reconocidas con una elevada especificidad. Las nucleocápsidas se alinean con las glicoproteínas y geman a través de ellas, quedando recubiertas por las glicoproteínas en el proceso. El resultado final es un virión con envoltura, formado por una nucleocápsida central y una envoltura membranosa cuyos lípidos proceden de la célula hospedadora pero cuyas proteínas están codificadas por el virus. Por sí mismo, el proceso de gemación no causa daños detectables a la célula, que puede continuar liberando viriones de ese modo por tiempo considerable. (Se producen daños sobre el hospedador, pero están causados por factores desconocidos.)

Virus de la gripe y otros ortomixovirus

Otro grupo de virus con cadena de polaridad negativa y de gran importancia es el de los *ortomixovirus*, que contiene el virus de la *gripe* en humanos. El término *mixo* indica que estos virus interaccionan con el *mucus* de las superficies celulares. En el caso del virus de la gripe, este mucus es el de las membranas mucosas del tracto respiratorio, ya que estos virus se transmiten fundamentalmente por la ruta respiratoria (*véase* Sección 26.8). El término *orto* se añade a este grupo para distinguirlo de otro grupo de virus con cadena negativa, los *paramixovirus*, que incluyen representantes tan importantes para los humanos como el virus de las paperas y el del sarampión. La biología molecular de los paramixovirus es, en realidad, similar a la de los rhabdovirus. Los ortomixovirus se han estudiado profusamente durante muchos años, empezando con la pandemia de gripe de 1918, que causó la muerte de millones de seres humanos en todo el mundo (*véase* Sección 26.8).

Los ortomixovirus son virus con envoltura en los que el RNA se presenta en el virión en forma de segmentos separados. Se dice, por tanto, que el genoma de los ortomixovirus es un **genoma segmentado**. En el caso del virus A de la gripe, el genoma está segmentado en *ocho* moléculas lineales unicatenarias cuyo tamaño varía de 890 a 2341 nucleótidos. La nucleocápsida del virus de la gripe es helicoidal, con 6-9 nm de diámetro y cerca de 60 nm de longitud. Esta nucleocápsida está incluida en una envoltura que tiene varias proteínas específicas del virus, así como lípidos derivados de la célula hospedadora (Figura 16.15).



P. W. Choppin y W. Stoeckenius

Figura 16.15 Estructura del virión de la gripe. (a) Micrografía electrónica. (b) Diagrama, mostrando algunos de los componentes.

Como el virus de la gripe abandona la célula por gemación, el virus no presenta una forma definida y se denomina polimórfico (Figura 16.15*a*). En la parte externa de la envoltura existen espículas que interaccionan con la superficie de la célula hospedadora. Un tipo de espícula se denomina *hemaglutinina*, porque provoca la aglutinación de los glóbulos rojos. (La aglutinación es un proceso por el que las células se agrupan cuando se mezclan con un anticuerpo u otra molécula proteica o de polisacárido que se combina específicamente con una sustancia de la superficie celular, como se describe en la Sección 24.8.) Si las células que experimentan aglutinación son los glóbulos rojos o hematíes, el proceso se denomina *hemaglutinación* (el término *hema* se refiere a la *sangre*). El glóbulo rojo no es el tipo de célula que el virus suele infectar normalmente, pero contiene en su superficie el mismo componente de membrana, caracterizado químicamente como *ácido siálico*, que presentan las células de la mucosa del tracto respiratorio. Por tanto, los glóbulos rojos constituyen meramente un tipo celular conveniente para medir la actividad aglutinante. Una característica importante de la hemaglutinina del virus de la gripe es que los anticuerpos dirigidos contra esta hemaglutinina *evitan* que el virus infecte la célula. En consecuencia, un anticuerpo dirigido contra la hemaglutinina *neutraliza* el virus y éste es el mecanismo por el que se desarrolla inmunidad frente a la gripe en el proceso de inmunización (*véanse* Secciones 22.11 y 26.8).

Un segundo tipo de espícula en la superficie del virus es una enzima llamada *neuramidinasa* (*véase* Figura 16.15). La neuraminidasa rompe el ácido siálico de la membrana citoplasmática, que es un derivado del ácido neuramínico. Esta enzima parece funcionar principalmente durante el proceso de ensamblaje vírico, destruyendo el ácido siálico de la membrana del hospedador que podría bloquear el ensamblaje o quedar incorporado en la partícula vírica madura.

Además de la neuraminidasa, el virus posee otras dos enzimas, la *RNA polimerasa dependiente de RNA*, que interviene en la conversión de una cadena negativa en positiva (como ya se comentó en el caso de los rhabdovirus), y una *endonucleasa de RNA*, que corta un cebador de los precursores del mRNA con encabezamiento.

La partícula vírica penetra por un proceso de *endocitosis*. Una vez dentro del citoplasma, la nucleocápsida se separa de la envoltura y emigra al núcleo, donde ocurre la *replicación* del ácido nucleico vírico. La *decapsidación* ocasiona la activación de la RNA polimerasa vírica. Las moléculas de mRNA se originan en el núcleo por *transcripción* del RNA vírico utilizando oligonucleótidos que derivan de los extremos 5′ de mRNAs celulares con encabezamiento recién sintetizados como cebadores. Por tanto, los mRNAs víricos presentan encabezamiento en los extremos 5′. Luego se añaden a los mRNAs víricos los extremos de poli-A y estas moléculas se desplazan al citoplasma.

Aunque el virus de la gripe se replica en el núcleo, las *proteínas* del virus se sintetizan en el citoplasma. Los *ocho* segmentos del genoma vírico codifican *diez* proteínas víricas. Los mRNAs formados a partir de los seis segmentos codifican cada uno una proteína única, mientras que los otros dos fragmentos codifican dos proteínas cada uno. Esto no ocurre por utilización de un mRNA verdaderamente policistrónico, como en los procariotas, ya que los ribosomas eucariotas por lo general reconocen sólo el codón AUG más próximo al extremo 5′ del mRNA como codón de iniciación (*véase* Sección 7.15). Por tanto, pueden hacer solameante una proteína a partir de un RNA dado. Los mRNAs transcritos originalmente de los dos segmentos se traducen cada uno en una proteína. En cada caso, sin embargo, se traduce otra proteína adicional a partir de estos mensajeros, después de que han sido procesados por la maquinaria de maduración de los RNA de la célula. Como en el caso de los genes que se solapan, éste es otro ejemplo de cómo los virus con RNA sacan el mayor provecho de su pequeño genoma.

Algunas de estas proteínas están relacionadas con la replicación del RNA vírico y otras son proteínas estructurales del virión. La estrategia global de la síntesis de RNA es semejante a la de los rhabdovirus, con una transcripción primaria que origina la formación de cadenas *positivas* que sirven de molde para obtener las moléculas de polaridad *negativa* de la descendencia. Se desconocen todavía algunos detalles del *ensamblaje*. Como en el caso de los rhabdovirus, la formación de la partícula vírica completa con envoltura ocurre mediante un proceso de gemación.

El genoma segmentado del virus de la gripe tiene algunas consecuencias de importancia práctica. Este virus y otros de esta familia presentan un fenómeno denominado **cambio antigénico** en el que se asocian fragmentos del RNA genómico de dos cepas genéticamente distintas que han infectado la misma célula. Esto ocasiona un cambio en los antígenos de superficie del virus, que hace que éste sea resistente al anticuerpo formado en un proceso de inmunización previa (*véase* Sección 26.8). El cambio antigénico hace posible que el nuevo virus formado infecte hospedadores que las cepas parentales no podían infectar. Se cree que el cambio antigénico es la causa de las epidemias de gripe más importantes.

✓ 16.8 Revisión de conceptos

En diversos virus con RNA de cadena negativa el RNA vírico no actúa directamente como mensajero, sino que es copiado a mRNA por una RNA polimerasa dependiente de RNA presente en el virión. Un virus importante de este grupo es el de la gripe.

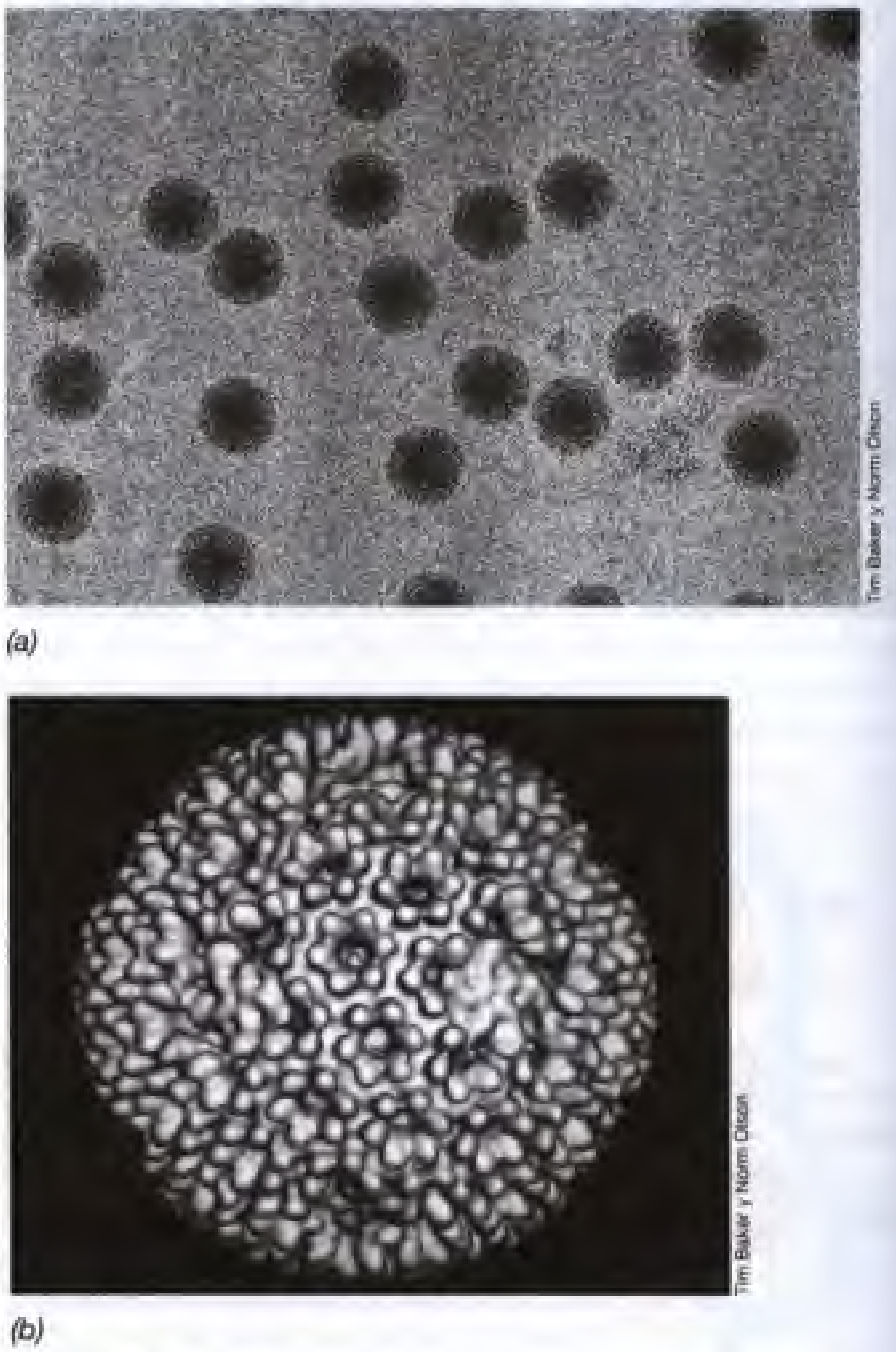
- ✓ ¿Por qué es necesario que los virus con cadena negativa lleven una enzima en sus viriones?
- ✓ ¿Qué es un *genoma segmentado*?

16.9 Virus con RNA bicatenario: reovirus

Los reovirus (o *Reoviridae*) constituyen una importante familia de virus animales que tienen un genoma formado por *RNA bicatenario*. El nombre de *reovirus* es un acrónimo formado por las palabras inglesas *respirator*, *enteric* y *orphan*. Este último término (huérfano) hace referencia a que los primeros virus que se aislaron de este grupo no estaban asociados a ninguna enfermedad. Sin embargo, los *rotavirus*, miembros de la familia de los reovirus, son probablemente la causa más común de diarrea en niños de 6 a 24 meses de edad. Los rotavirus también provocan diarrea en animales jóvenes.

Como se ha indicado, el RNA de los reovirus es bicatenario. Se trata del mayor grupo de virus animales con RNA bicatenario; en el resto de grupos de virus animales (incluyendo los que aparecen en la Figura 9.22, la mayoría tienen RNA unicatenario. También se conocen, reovirus que infectan plantas, y ya se ha mencionado que el bacteriófago $\phi 6$ parece estar estrechamente relacionado con los reovirus (*véase* Sección 16.1).

La partícula de reovirus consta de una nucleocápsida sin envoltura, de 60-80 nm de diámetro, con una *doble* cápsida de simetría icosaédrica (*véase* Figura 16.16). Como pue-



Tim Baker y Norm Olson

Tim Baker y Norm Olson

Figura 16.16 (a) Micrografía electrónica con varios viriones de reovirus (cada uno, de aproximadamente 70 nm). (b) Reconstrucción tridimensional del virión de un reovirus realizada a partir de imágenes de viriones criohidratados.

de predecirse, estos virus con RNA bicatenario contienen dentro del virión las enzimas codificadas por el virus que son necesarias para sintetizar RNA.

El genoma de los reovirus consta de 10-12 moléculas de RNA bicatenario. El RNA doble es más difícil de desenrollar que el DNA bicatenario. La replicación del RNA ocurre de un modo asimétrico. Primero, una cadena sirve como molde, y luego el producto unicatenario originado sirve como molde para formar una doble hélice. La dificultad de desenrollar esta estructura y la susceptibilidad del RNA unicatenario a la rotura dentro de la célula, limita de un modo efectivo el tamaño que puede alcanzar la molécula bicatenaria. La segmentación del genoma en varias moléculas parece ser una adaptación para evitar esos problemas.

La replicación del RNA del reovirus tiene lugar únicamente en el citoplasma del hospedador. El RNA bicatenario está inactivo como mRNA y el primer paso en la replicación del reovirus es la transcripción, empleando la cadena negativa como molde para fabricar el mRNA. Generalmente, cada molécula de RNA en el genoma codifica una sola proteína, aunque en unos pocos casos la proteína formada se escinde para suministrar el producto final. Sin embargo, uno de los mRNA que se obtienen codifica de hecho dos proteínas, con lo que el RNA *no* se tiene que modificar para realizar esa función. Aparentemente, en ocasiones un ribosoma «pierde» el codón de iniciación del segundo gen. En consecuencia, hay algunas excepciones a la generalización de que los ribosomas eucariotas se inician en el primer codón AUG del mRNA.

La replicación de los reovirus parece tener lugar dentro de un equivalente intracelular a la nucleocápsida vírica que se denomina *partícula subvírica*, y que se mantiene intacta en la célula. Cada uno de los 10 RNAs unicatenarios, con encabezamiento y polaridad positiva, es ensamblado cuerpo sintetizador con RNA bicatenario. Las cadenas positivas de RNA actúan como molde para la síntesis de los RNAs genómicos negativos, generándose los RNA víricos de la descendencia. Este RNA bicatenario es posteriormente encapsidado y, cuando hay suficientes proteínas víricas de la cápsida, los viriones maduros completan el ensamblaje.

En las fases iniciales del proceso infectivo, el virión se une a una proteína celular. Tras la fijación, el virus penetra en la célula y es transportado a los lisosomas. Dentro de los lisosomas se modifica la envoltura externa de la partícula vírica mediante la eliminación de dos proteínas y la hidrólisis de otra por las enzimas del lisosoma. Este proceso de decapsidación activa la RNA polimerasa dependiente de RNA y, por tanto, inicia el proceso de replicación vírica.

✓ 16.9 Revisión de conceptos

Los reovirus forman un gran grupo cuyo genoma consiste en RNA bicatenario segmentado. Al igual que los virus RNA de cadena negativa, los virus RNA bicatenarios tienen en el virión una polimerasa RNA dependiente de RNA.

✓ ¿Por qué los virus con genoma RNA bicatenario tienen también genomas segmentados?

16.10 Replicación de virus de animales con DNA bicatenario

En el Sistema de Clasificación de Baltimore (*véase* Sección 9.7), los virus DNA bicatenarios aparecen en la Clase I y los unicatenarios en la Clase II. Así como hay diferentes bacteriófagos conocidos de la Clase II (*véanse* Secciones 16.2 y 16.3), y varios virus de plantas en esa clase, se conocen relativamente pocos que infecten animales. La familia más extensa de virus animales de la Clase II son los parvovirus, *Parvoviridae*, algunos de los cuales infectan vertebrados y otros infectan insectos. Sin embargo, hay un número muy grande de virus de la Clase I que infectan animales.

Entre estos virus DNA bicatenarios hay varias familias cuyos miembros pueden infectar humanos. Entre ellos se encuentran los *Polyomaviridae* y los *Papillomaviaridae* (ambas familias se conocían anteriormente como *Papoviridae*), *Herpesviridae* (herpesvirus), los *Poxviridae* (poxvirus), y *Adenoviridae* (adenovirus). Todos se replican en el núcleo excepto los poxvirus, que lo hacen en el citoplasma. En las siguientes secciones, se trata la replicación de cada una de estas familias.

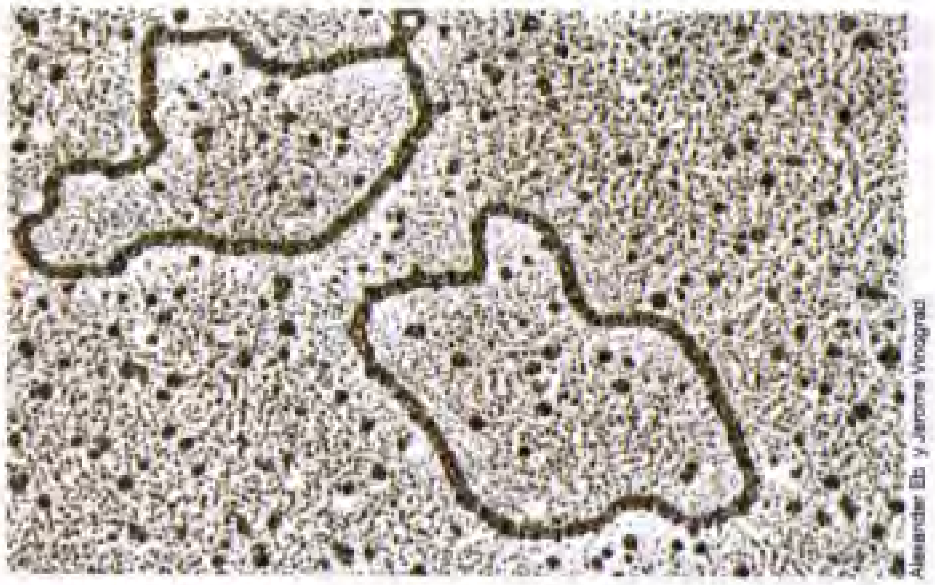
Poliomavirus: SV40

Algunos virus de la familia de los poliomavirus tienen la propiedad de inducir tumores en animales; de hecho, *oma* significa tumor. Uno de estos virus tumorales con DNA se aisló inicialmente de monos y se llamó «*simian virus* 40» o SV40. En la década de 1950, millones de personas resultaron inoculadas sin saberlo con SV40, que era un contaminante en las preparaciones iniciales de las vacunas contra poliovirus. Por fortuna, parece que no se produjeron complicaciones médicas. Este virus fue uno de los primeros elementos genéticos que se estudió en detalle por técnicas de ingeniería genética y se ha usado ampliamente como *vector* para el intercambio de genes en células eucarióticas (*véase* Sección 31.4).

El virión del SV40 es una partícula simple, sin envoltura, de 45 nm de diámetro, con cápsida icosédrica que contiene 72 subunidades proteicas. El virión no lleva enzimas. Sin embargo, además de las proteínas de la cápsida, tiene cuatro *proteínas tipo histona*, derivadas de la célula hospedadora, que forman un complejo con el DNA vírico. Cuando comentamos la estructura del cromosoma (*véase* Sección 7.3), ya mencionamos las histonas y destacamos su papel en la neutralización de las cargas negativas de los fosfatos del DNA y su contribución al empaquetamiento del DNA en configuraciones más compactas.

El genoma del SV40 es una molécula circular de DNA bicatenario con 5.243 pares de bases (Figura 16.17), que se presenta en forma superenrollada dentro del virión. Se ha determinado la secuencia completa de bases del genoma del SV40 y en la Figura 16.18 se muestra su mapa genético.

El ácido nucleico se sintetiza en el núcleo pero las proteínas se forman en el citoplasma. El ensamblaje final de las partículas víricas tienen lugar en el núcleo. La replicación de estos virus se puede dividir en dos fases distintas, *temprana* y *tardía*. En la fase temprana se transcribe la *región temprana* del DNA (Figura 16.18). La RNA polimerasa ce-



Alexander Eb y Jerome Vinograd

Figura 16.17 Micrografía electrónica del DNA circular de un virus tumoral. El perímetro aproximado de cada círculo es 1,5 μm.

lular produce una única molécula de RNA como transcrito primario, pero sufre luego un procesamiento originando *dos especies de mRNA*, una grande y otra pequeña. El DNA del SV40 posee *intrones* que son eliminados del transcrito primario. En el citoplasma, el mRNA vírico se traduce formando dos proteínas. Una de ellas, el antígeno T, se une al *origen de replicación* del DNA genómico parental.

El DNA vírico del SV40 es demasiado pequeño para codificar sus propias DNA polimerasas y usa las DNA polimerasas de la célula hospedadora. La replicación ocurre de modo bidireccional a partir de un único origen de replicación (la denominada replicación *t*; *véase* Figura 7.16). El proceso implica los mismos sucesos que se han descrito ya para la replicación del DNA de la célula hospedadora (*véanse* Secciones 7.5 y 7.6).

Las moléculas de mRNA tardío del SV40 se sintetizan usando como molde la cadena complementaria a la usada para la síntesis de mRNA temprano (*véase* Figura 16.18). La transcripción comienza en un promotor próximo al origen de replicación. Este RNA tardío se procesa luego por escisión y poliadenilación, dando las formas de mRNA correspondientes a las tres proteínas de la cápsida. Estos genes se superponen y parte de la secuencia nucleotídica contiene información correspondiente a las tres proteínas. Las moléculas de mRNA tardío se transportan al citoplasma y se traducen para formar las proteínas de la cápsida vírica. Estas proteínas son luego transportadas de nuevo al núcleo, donde tiene lugar el ensamblaje del virión.

Cuando un virus del grupo de los poliomavirus infecta una célula, pueden ocurrir dos cosas, dependiendo del tipo de célula hospedadora. En algunos tipos celulares, conocidos como células *permisivas*, la infección vírica ocasiona la formación de nuevos viriones y la lisis de la célula infectada. En otros tipos, en las células llamadas *no permisivas*, no ocurre multiplicación sino que el virus se integra en algunas células hospedadoras originando nuevas células alteradas genéticamente. Con frecuencia, tales células muestran pérdida de la inhibición del crecimiento por contacto y se llaman células *transformadas* o tumorales.

En células no permisivas, la transformación ocurre cuando se expresan las proteínas tempranas pero el DNA vírico no se replica independientemente. El DNA vírico no se replica, sino que se integra establemente en el DNA de la célula transformada (Figura 16.19). La integración puede ocurrir por muchos sitios del genoma celular y del vírico. En esta forma integrada, se forman dos proteínas víricas que son esenciales para el mantenimiento de la integración estable del DNA vírico, pero no se sintetiza ninguna proteína estructural del virus. Algunas células transformadas se convierten en células productoras de virus, tras un proceso que probablemente conlleva la escisión del genoma vírico de la célula hospedadora.

El estudio del modo de replicación del SV40 ha permitido aclarar aspectos importantes del modo por el que los virus pueden ocasionar el estado canceroso de la célula. Sin embargo, los virus con DNA de otros grupos también pueden producir la transformación cancerosa, por ejemplo el papilomavirus humano, un miembro de la familia *Papillomaviridae*. Además, la importante familia de los *retrovirus* está formada también por virus oncogénicos, aunque tienen un modo de replicación completamente diferente (*véase* Sección 16.14).

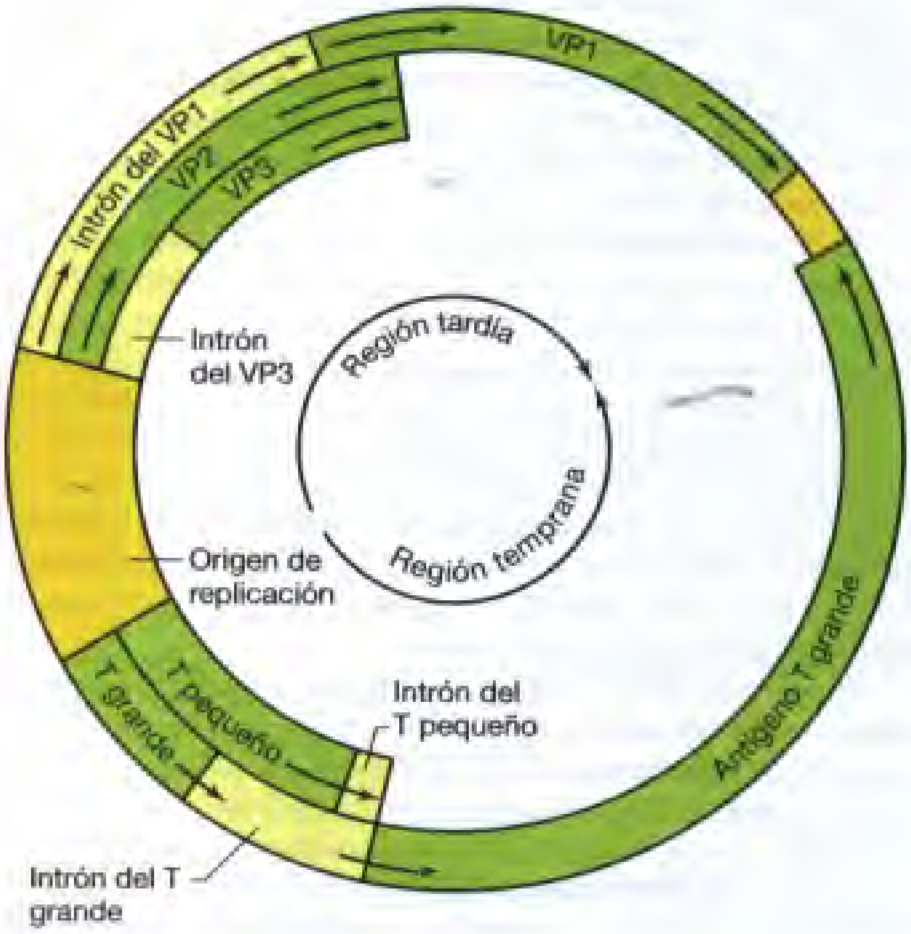


Figura 16.18 Mapa genético del papovavirus SV40. Los genes VP1, VP2 y VP3 codifican las tres proteínas que forman la cubierta de SV40. Las flechas indican el sentido de la transcripción.

✓ 16.10 Revisión de conceptos

La mayoría de virus animales con DNA bicatenario se replican en el núcleo. Algunos virus causantes de cáncer y otras alteraciones en las células animales poseen DNA bicatenario. En un hospedador permisivo, el virus puede causar muerte y lisis,

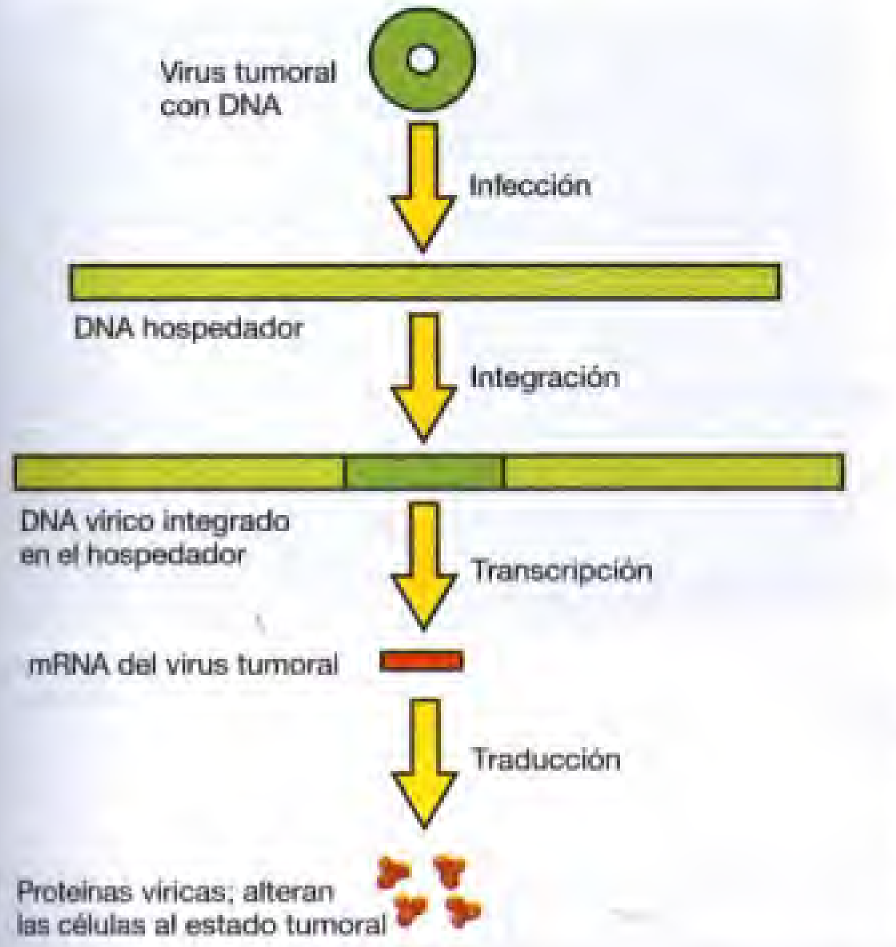


Figura 16.19 Esquema general de los procesos moleculares que ocurren durante la transformación celular por un virus tumoral con DNA, como el SV40. El DNA vírico se incorpora, por completo o en parte, en el DNA de la célula hospedadora. Los genes víricos que codifican la información transformadora se transcriben y procesan a moléculas de mRNA vírico, que se transportan al citoplasma. Allí se traducen dando proteínas transformadoras o antígenos T, que tienen funciones que pueden convertir las células del hospedador en células cancerosas.

pero en uno no permisivo puede transformar la célula hospedadora infectada en una célula tumoral.

- ✓ ¿Por qué no se espera de un virus como el SV40 que transporte enzimas en el virión?
- ✓ ¿Cómo puede un transcrito producir más de un mRNA?

16.11 Virus con DNA bicatenario: herpesvirus

Los herpesvirus (o *Herpesviridae*) son un gran grupo de virus con DNA bicatenario que causan una amplia variedad de enfermedades en humanos y en otros animales, incluyendo ampollas febriles (herpes labial), herpes venéreo, varicela, herpes zóster, erupciones y mononucleosis infecciosa. Algunas de estas enfermedades se comentan en el Capítulo 26. Una característica interesante de algunos herpesvirus es su capacidad para permanecer *latentes* en el cuerpo por largos periodos de tiempo y de activarse solamente bajo condiciones de estrés. Tanto el virus del *herpes simple*, que causa *ampollas febriles*, como el virus *varicela-zóster*, que origina la *varicela* y las erupciones del *herpes zóster*, son capaces de permanecer latentes en las neuronas de los ganglios sensoriales, de los que emergen para causar infecciones de la piel.

Un grupo importante de herpesvirus son tumorales y causan cáncer. Un herpesvirus oncogénico es el *virus de Epstein-Barr*, que produce el *linfoma de Burkitt*, un tumor común entre los niños de África Central y Nueva Guinea. El linfoma de Burkitt fue uno de los primeros tipos de cáncer en humanos que se relacionó con una infección por virus (*véase* Tabla 9.3).

Biología molecular de los herpesvirus

La *partícula vírica de un herpesvirus* tiene una estructura compleja y consta de cuatro unidades morfológicas distintas. En el tipo I del herpes simple, que es un virus de unos 50 nm de diámetro con envoltura (Figura 16.20*a*), el centro de la partícula es una zona densa a los electrones, un «núcleo», compuesta de *DNA bicatenario*. Rodeando esta zona está la nucleocápsida, con simetría icosaédrica, que está compuesta por 162 capsómeros, cada uno de los cuales comprende varias proteínas. Fuera de la nucleocápsida se encuentra una capa amorfa que se llama el *tegumento*, que es una estructura fibrosa peculiar de los herpesvirus. Rodeando el tegumento hay una *envoltura* cuya superficie externa contiene muchas *espículas* pequeñas. Dentro del virión existe un gran número de proteínas diferentes, pero no todas ellas han sido caracterizadas.

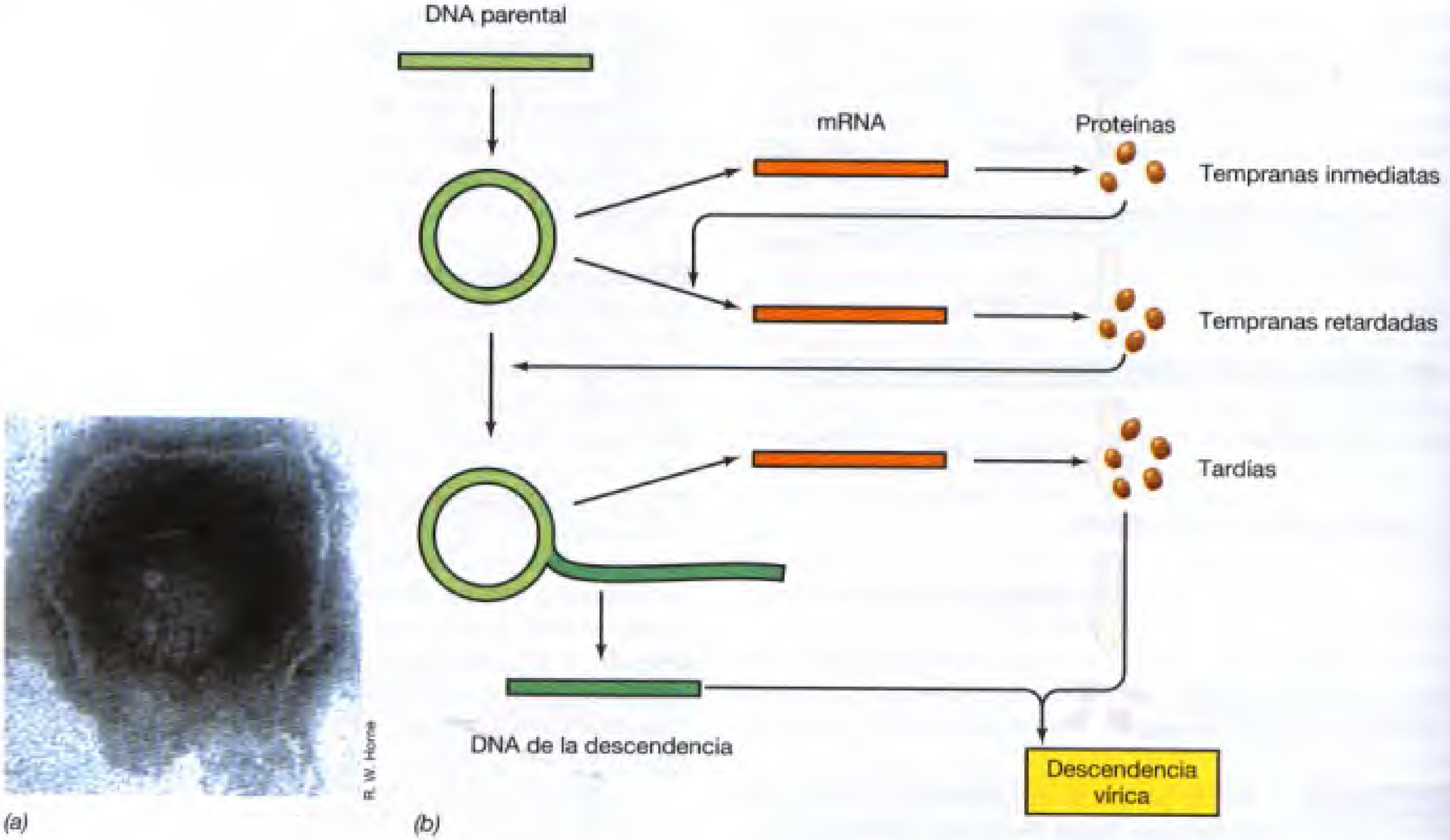
El genoma del herpes simple tipo I presenta una larga molécula lineal de DNA bicatenario con 152.260 pares de bases (unas 30 veces más largo que el genoma del SV40), y codifica al menos 84 proteínas diferentes.

La infección ocurre por la fijación de la partícula vírica a receptores celulares específicos y, tras la fusión de la membrana citoplasmática con la envoltura del virus, se libera la nucleocápsida dentro de la célula. La nucleocápsida se transporta luego al núcleo, donde el DNA es decapsidado. Los componentes de la partícula vírica inhiben la síntesis de macromoléculas del hospedador.

Hay *tres clases de RNAs mensajero*: el temprano inmediato (también llamado alfa, α, que codifica cinco proteínas reguladoras); el temprano retardado (también llamado beta, β, que codifica proteínas relacionadas con la replicación del DNA, incluyendo la timidina kinasa y la DNA polimerasa); y el tardío (también denominado gamma, γ, que codifica proteínas estructurales de la partícula vírica) (Figura 16.20*b*). durante la etapa *temprana inmediata*, una RNA polimerasa celular transcribe casi un tercio del genoma vírico. El mRNA temprano codifica ciertas proteínas reguladoras que parecen estimular la síntesis de las proteínas tempranas retardadas. La segunda etapa, la fase *temprana retardada*, sólo tiene lugar después de que se han formado las proteínas tempranas. En dicha etapa se transcribe cerca de un 40% del genoma vírico. Entre las 10 proteínas caracterizadas en esta etapa hay una *DNA polimerasa*, enzimas responsables de la síntesis de desoxirribonucleótidos, y una *proteína de unión al DNA*. Estas enzimas están implicadas en el proceso de replicación viral.

La síntesis del DNA del herpes ocurre en el núcleo. Tras la infección, el genoma del herpes parece circularizarse (de modo muy parecido al del bacteriófago lambda; *véase* Sección 9.10) y la replicación tiene lugar por el mecanismo del círculo rodante (*véase* Figura 9.20). Sin embargo, parece

UNIVERSIDAD DE TALCA
BIBLIOTECA CENTRAL



R. W. Horne

Figura 16.20 Herpesvirus. (a) Micrografía electrónica de una partícula de herpesvirus. El diámetro aproximado de la partícula es 150 nm. (b) Proceso de multiplicación del virus del herpes simple.

haber tres orígenes. Se forman largos concatámeros que luego se procesan durante el mismo proceso de ensamblaje para originar DNA con la longitud del genoma vírico (de manera similar a lo descrito para los bacteriófagos con DNA; *véanse* Secciones 9.9 y 16.4).

Las nucleocápsidas víricas se ensamblan en el núcleo y el virus adquiere la envoltura durante el proceso de gemación a través de la *membrana interna del núcleo*. Posteriormente, los viriones maduros se liberan al exterior de la célula a través del retículo endoplasmático. Por tanto, el ensamblaje de este virus con DNA y envoltura difiere notablemente del de los virus con RNA y envoltura, que son ensamblados en la membrana *citoplasmática* en lugar de en la membrana *nuclear*.

✓ 16.11 Revisión de conceptos

Se conoce un grupo abundante de diferentes herpesvirus que provocan enfermedades en humanos. Como en el caso del bacteriófago lambda, la cadena bicatenaria de estos virus se circulariza y en apariencia se replica gracias al mecanismo del círculo rodante. También, como en el caso de lambda, estos bacteriófagos en ocasiones se mantienen en un estado latente en el hospedador.

✓ ¿Qué utilidad tiene para los herpesvirus circularizar su DNA antes de la replicación?

✓ ¿Dónde se une la nucleocápsida de un herpesvirus?

16.12 Virus con DNA bicatenario: poxvirus

Los poxvirus están entre los virus de animales más complejos y más grandes conocidos (Figura 16.21), y poseen algunas características que los aproximan a células primitivas. Sin embargo, los poxvirus, como todos los virus, son incapaces de metabolizar y por tanto, dependen del hospedador para disponer de la maquinaria necesaria para la síntesis de proteínas. Estos virus son también únicos por ser virus con DNA que se replican en el *citoplasma*. Otro grupo de virus DNA bicatenario también se replica en el citoplasma. Por ejemplo, los iridovirus, algunos de los cuales poseen genomas incluso mayores a los poxvirus. Por tanto, una célula infectada con un poxvirus exhibe *síntesis de DNA fuera del núcleo*, algo que sólo ocurre en orgánulos intracelulares como las mitocondrias.

Propiedades generales de los poxvirus

Los poxvirus han tenido importancia médica e histórica. El virus de la *viruela* fue el primero en ser estudiado con cierto detalle y el primero frente al que se desarrolló una vacuna (descrita por Edward Jenner en 1798). Mediante una aplicación adecuada de esta vacuna a nivel mundial la viruela ha sido *erradicada* en su estado silvestre, lo que la hace la primera enfermedad infecciosa eliminada de esta manera. Otros poxvirus de importancia son el de la *viruela de las*

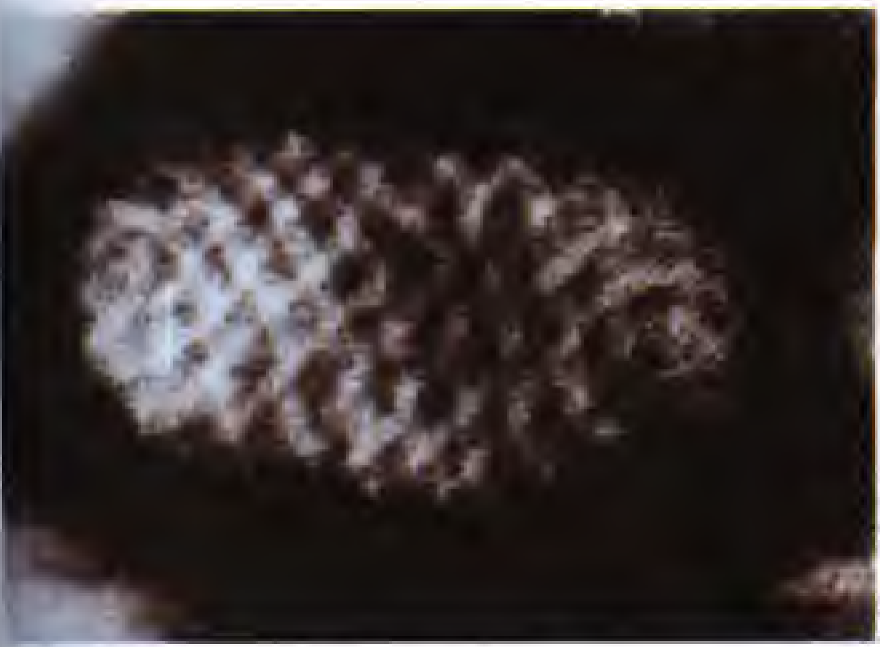

D. Dales y F. Fenner

Figura 16.21 Micrografía electrónica de un virión del virus de la vacuna por tinción negativa. El virión tiene aproximadamente 400 nm (0,4 µm) de longitud.

vacas y el de la *mixomatosis de los conejos*, un agente infeccioso muy importante que fue intencionalmente introducido en Australia para intentar controlar la población de conejos (*véase* Sección 25.5). Algunos poxvirus también originan tumores.

Los poxvirus son tan grandes que pueden verse con el microscopio óptico. La mayor parte de la investigación ha sido realizada con el *virus vaccinia*, que constituye la fuente de la vacuna frente a la viruela. El virus vaccinia tiene una estructura en forma de bloque rectangular de 400 × 240 × 200 nm de tamaño. En su superficie más externa el virión está recubierto con túbulos o filamentos colocados en una disposición membranosa, aunque el virus no tiene membrana lipídica porque esta estructura externa consta sólo de proteína. Dentro del virión hay dos cuerpos laterales de composición desconocida y una zona central, *la nucleocápsida*, que contiene el DNA rodeado por una capa de subunidades proteicas.

El genoma de un poxvirus es DNA bicatenario. El genoma del virus vaccinia presenta cerca de 185 kb y contiene entre 150 y 200 genes. El DNA de los poxvirus resulta interesante porque las dos cadenas de la doble hélice se entrecruzan a consecuencia de la formación de enlaces fosfodiéster entre cadenas adyacentes (como en la estructura en horquilla mostrada en la Figura 7.8). Los extremos del DNA del poxvirus son, por tanto, muy parecidos a los de los virus de *Chlorella* (*véase* Sección 16.6).

Replicación de los poxvirus

Los viriones del virus vaccinia penetran en las células mediante un proceso de fagocitosis y posterior liberación de las nucleocápsidas (*core*) en el citoplasma. Resulta interesante notar que la decapsidación del genoma vírico requiere la acción de una nueva proteína que es sintetizada tras la infección. Esta proteína está codificada por el DNA vírico, y el gen que la especifica se transcribe mediante una RNA polimerasa que está presente *dentro* de la partícula vírica. Además de este gen decapsidante, se transcriben otros genes víricos. Los transcritos primarios se convierten en mRNAs por adición del encabezamiento y poliadenilación mientras se encuentran todavía dentro de la núcleocápsida vírica.

Después de que el DNA del virus de la vacuna está decapsidado por completo, comienza en el citoplasma la formación de *cuerpos de inclusión*. Dentro de estos cuerpos de inclusión se produce la transcripción, replicación y encapsidación de las partículas de la descendencia vírica. Cada virión infectivo inicia la formación de su propio cuerpo de infección, de modo que el número de inclusiones depende de la multiplicidad de infección. Las moléculas de DNA sintetizadas forman un fondo común del que se van incorporando moléculas individuales a los viriones. Los viriones maduros se acumulan en el ciroplasma. No parece existir un mecanismo específico de liberación, y la mayor parte de los viriones se liberan sólo cuando la célula infectada se desintegra.

Poxvirus y vacunas recombinantes

El virus vaccinia se ha usado para albergar proteínas de otros virus alteradas genéticamente, permitiendo así la construcción de vacunas por ingeniería genética. Como veremos en el Capítulo 22, una vacuna es una sustancia capaz de poner en marcha una respuesta inmunitaria en un animal, y sirve para proteger al animal de una futura infección por el mismo agente. En humanos, el virus vaccinia no causa efectos serios sobre la salud pero es intensamente inmunogénico. Se han usado métodos de clonación molecular para expresar en los viriones del virus vaccinia proteínas víricas del virus de la gripe, de la rabia, del virus del herpes simple tipo I, o del virus de la hepatitis B. Después, estos virus vaccinia se han usado como vacunas (*véase* Sección 31.6).

Se ha desarrollado también un sistema similar de vacunación utilizando adenovirus (*véase* la sección siguiente) como vehículo portador ya que, como el virus vaccinia, los adenovirus no suelen presentar consecuencias importantes para la salud en humanos.

✓ 16.12 Revisión de conceptos

Los poxvirus, a diferencia de otros virus DNA que hemos ido comentando, se replican totalmente en el citoplasma. Son virus muy grandes cuyos viriones llevan varias enzimas. Estos virus son también responsables de diversas enfermedades humanas, pero, por ejemplo, las campañas de vacunación consiguieron erradicar el virus de la viruela en estado silvestre.

- ✓ ¿Qué tiene de destacable que los poxvirus repliquen su DNA en el citoplasma?

16.13 Virus con DNA bicatenario: adenovirus

Los adenovirus (o *Adenoviridae*) son una familia importante de virus icosaédricos con DNA. El término *adeno* procede del término latino «glándula», y se refiere al hecho de que estos virus se aislaron por vez primera de las amígdalas y glándulas adenoideas en humanos. Por lo general, los adenovirus causan infecciones respiratorias leves en humanos, y algunos de estos virus se aíslan de individuos aparentemente sanos.

Los genomas de los adenovirus constan de un DNA lineal bicatenario de unos 36 kb. En el extremo 5'del DNA se presenta una proteína unida por enlaces covalentes, que es un componente esencial para la infectividad del DNA. El DNA presenta repeticiones terminales invertidas de 100-1800 pares de bases (esto varía dependiendo de la cepa vírica).

La replicación del DNA vírico tiene lugar en el núcleo celular (Figura 16.22). Después de que la partícula vírica ha sido transportada al núcleo celular, el «núcleo» del virus queda liberado y se convierte en un complejo de DNA vírico-histona. La transcripción temprana la realiza una RNA polimerasa del hospedador, originando varios transcritos primarios. Estos transcritos son procesados por empalmado, encabezamiento y poliadenilación, dando lugar a varios mRNAs diferentes.

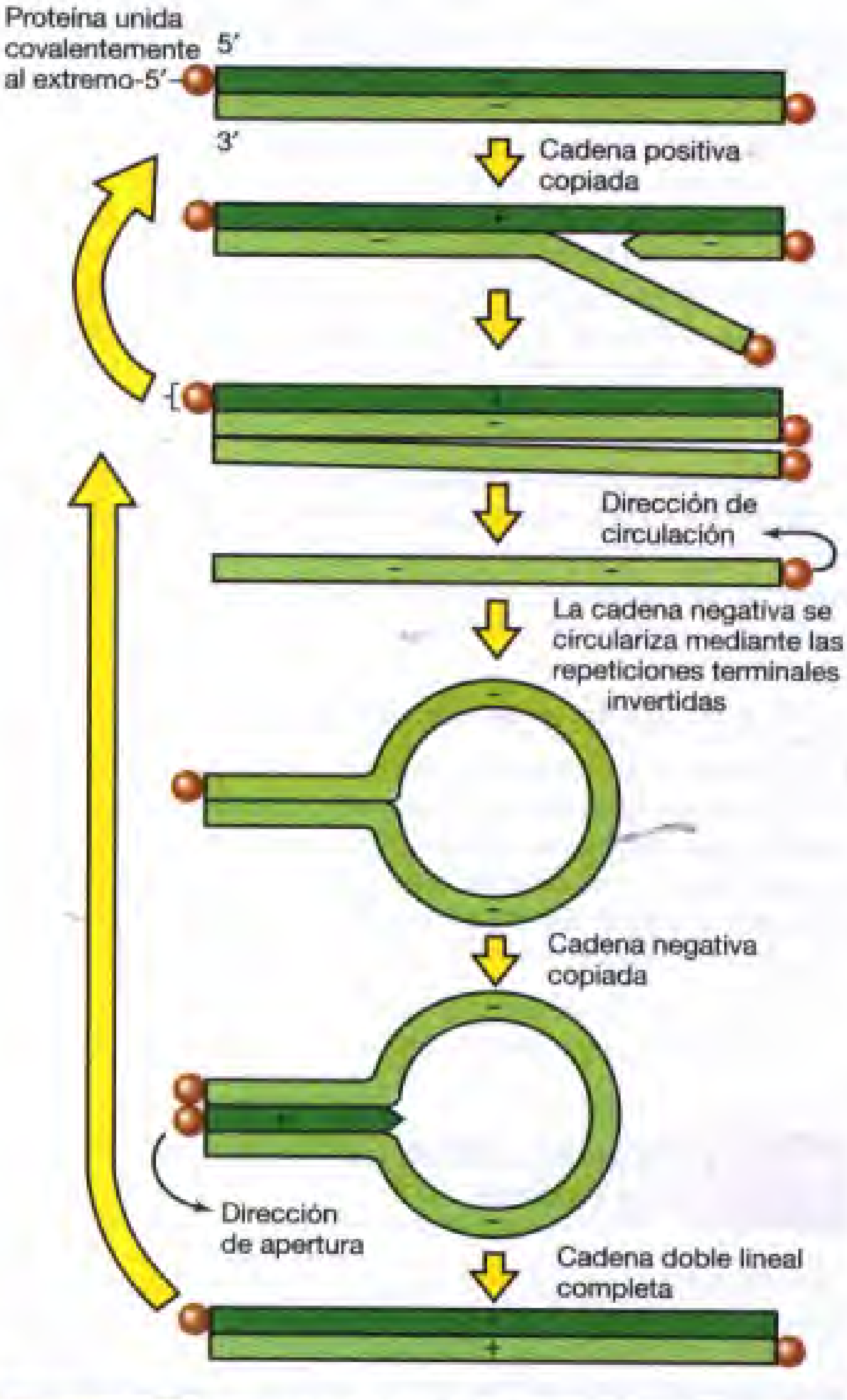

Proteína unida covalentemente al extremo-5'
5'
3'
Cadena positiva copiada
Dirección de circulación
La cadena negativa se circulariza mediante las repeticiones terminales invertidas
Cadena negativa copiada
Dirección de apertura
Cadena doble lineal completa

Figura 16.22 Replicación del DNA de los adenovirus. Para detalles, véase el texto.

Las proteínas tempranas están implicadas en la regulación de la replicación del DNA; las proteínas tardías son las proteínas de la cápsida vírica. La replicación del DNA vírico requiere como cebador una proteína, codificada por el virus, y otra proteína también codificada por el virus que actúa como DNA polimerasa. La replicación de una molécula lineal y bicatenaria de DNA, como el genoma de los adenovirus, puede iniciarse en cualquiera de los dos extremos o en ambos extremos simultáneamente (*véase* Figura 7.24). En el caso específico de los adenovirus la replicación comienza en *uno u otro* de los extremos y las dos cadenas se replican asincrónicamente. Los productos de una ronda replicativa son moléculas bi- y unicatenarias. Estas últimas se circularizan por medio de las repeticiones terminales invertidas, sintetizándose una nueva cadena complementaria a partir del extremo 5', dando como producto otra molécula bicatenaria (Figura 16.22). Este mecanismo de replicación es interesante porque no incluye la formación de fragmentos discontinuos de DNA en una de las cadenas, como ocurre en la replicación convencional del DNA (*véase* Sección 7.6).

✓ 16.13 Revisión de conceptos

Los diferentes virus animales con DNA bicatenario presentan estrategias diferentes de replicación. En las que emplean los adenovirus intervienen proteínas, cebadores y una forma de replicación que evita la síntesis de una cadena retrasada.

- ✓ ¿Cómo replican los adenovirus su genoma sin síntesis de una cadena retrasada?

16.14 Virus que utilizan la transcriptasa inversa

En la Sección 9.12 se han tratado los retrovirus, un grupo de virus que se replica utilizando la enzima transcriptasa inversa. Los retrovirus (familia *Retroviridae*) son uno de los elementos (genéticos) que se sirven de la transcriptasa inversa para la replicación. Ya se ha indicado que en algunas células eucariotas se han encontrado elementos genéticos, llamados retrotransposones, que son transposones que emplean transcriptasa inversa (*véase* Sección 9.12). Además, algunos «virus» fúngicos (que no tienen un estado extracelular), como los elementos Ty1 y Ty3 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se replican de forma muy parecida a los retrovirus. Hay incluso elementos genéticos en el dominio *Bacteria*, como el *retron*, encontrado en mixobacterias y en *Escherichia coli*, que emplean la transcriptasa inversa para replicarse.

Hay básicamente dos tipos diferentes de virus que se sirven de la transcriptasa inversa y son los más fácilmente diferenciables por el tipo de ácido nucleico del genoma de sus viriones. En la Clasificación de Baltimore, los retrovirus están considerados en la Clase VI y poseen *genomas RNA* en sus viriones. Sin embargo, también hay virus en la Clase VII que se replican con transcriptasa inversa, pero tienen genomas DNA en sus viriones. Son ejemplos los Hepadnavirus (*Hepadnaviaridae*) en animales (*véase* Figura 9.22) y los *Caulimoviridae* en plantas (de los cuales, el más estudiado es el virus del mosaico de la coliflor). En esta sección trataremos brevemente ambos tipos de virus con transcripción inversa, los RNA y los DNA.

Virus RNA de transcripción inversa: retrovirus

La información que aparece a continuación complementa la de la Sección 9.12. Hay que recordar que los retrovirus poseen viriones con envoltura que contienen *dos* copias separadas del genoma RNA (*véase* Figura 9.24). El virión también contiene algunas enzimas, entre ellas, transcriptasa inversa y una tRNA específica. El motivo por el que se necesitan enzimas es que, aunque el genoma de los retrovirus es de polaridad positiva, con encabezamiento y cola poliadenilada, *no se usa* directamente como RNA mensajero. En su lugar, una de las copias del genoma se convierte en DNA por la acción de la transcriptasa inversa, quedando integrado en el genoma del hospedador. Aunque en la Sección 9.12 ya se trató la replicación retrovírica (*véase* Figura 9.25), aquí se ofrecen algunos detalles más.

El DNA que se forma es una molécula bicatenaria lineal que es sintetizada en el citoplasma dentro de una nucleocápsida vírica sin envoltura. En la Figura 16.23, se muestra un esquema de la transcripción inversa del RNA vírico dando DNA.

La enzima transcriptasa inversa es esencialmente una DNA polimerasa, pero en realidad lleva a cabo *tres* actividades enzimáticas: (1) síntesis de DNA con un molde de RNA (transcripción inversa), (2) síntesis de DNA con un molde de DNA, y (3) actividad de ribonucleasa H (una actividad que degrada la cadena RNA de un híbrido RNA:DNA). Al igual que todas las polimerasas DNA, la transcriptasa inversa necesita un cebador para la síntesis de DNA. El cebador para la transcripción inversa de retrovirus es una *RNA de transferencia celular* (*tRNA*). El tipo de tRNA que se usa como cebador depende del virus y llega al virión a partir de la célula hospedadora previa.

Con el cebador tRNA, los alrededor de 100 nucleótidos del extremo 5′ del RNA se transcriben en el DNA. Una vez que la transcripción alcanza el extremo 5′ del RNA, el proceso de transcripción se detiene. Para copiar el RNA restante, que es el conjunto del RNA del virus, entra en acción un mecanismo diferente. En primer lugar, se eliminan las secuencias RNA terminales redundantes en el extremo 5′ de la molécula por la acción de otra actividad enzimática de la transcriptasa inversa, la *ribonucleasa H*. Esto lleva a la formación de un DNA unicatenario pequeño, que es complementario al segmento RNA en *el otro extremo* del RNA vírico. La pieza pequeña de DNA unicatenario, hibrida entonces con el otro extremo de la molécula RNA vírica, donde continúa el copiado de las secuencias RNA víricas. Como se resume en la Figura 16.23, la acción continuada de la transcriptasa inversa y de la ribonucleasa H lleva a la formación de una molécula DNA bicatenario con largas repeticiones terminales (LTR) en cada extremo. Estas LTRs contienen potentes promotores de la transcripción y participan en el proceso de integración. La integración del DNA vírico en el genoma hospedador es análoga a la integración de Mu (*véase* Sección 16.5) o de un transposón bacteriano en un genoma bacteriano. La integración puede ocurrir en cualquier lugar del DNA celular, y una vez integrado, el elemento, ahora denominado *provirus*, es un elemento genético estable. Como provirus, puede expresar su información genética o puede permanecer en un estado latente y no expresarse.

Si se activan los promotores en el LTR adecuado, el DNA provírico integrado se transcribe por la acción de una polimerasa RNA celular en transcritos que están modificados en el extremo 5′ y poliadenilados. Estos transcritos de RNA pueden ser o bien encapsidados en partículas víricas, o bien procesados y traducidos a proteínas víricas.

La Figura 9.24 muestra los mapas genéticos simplificados de dos retrovirus diferentes. También hemos tratado brevemente la expresión génica en la Sección 9.12. Todos los retrovirus funcionales tienen al menos los tres genes *gag*, *pol*, y *env*, en ese orden. La transcripción a partir de la copia del DNA integrado da lugar a un genoma de RNA completo que está modificado en el extremo 5′ (con encabezamiento) y en el 3′ (con cola poli A) y puede usarse como mRNA, o empaquetarse en nuevos viriones.

En la Figura 16.24, se muestra la traducción y el procesado de este mRNA a partir de un retrovirus simple. Nótese que el «gen» *gag* en el extremo 5′ del mRNA codifica en realidad varias pequeñas proteínas. Éstas son sintetizadas como una poliproteína que es posteriormente procesada por una proteasa (que es, a la vez, una parte de la poliproteína). Estas proteínas construyen la cápsida (y la proteasa queda empaquetada en el virión). El gen *pol* es el siguiente, y se traduce como una poliproteína con las *proteínas* gag. Es interesante advertir que es producida en pequeñas cantidades porque, dependiendo del retrovirus, un ribosoma que traduce el gen *pol* tiene que o bien leer a través del codón en el extremo del gen *gag*, o bien hacer un cambio preciso a otra pauta de lectura en esa región. (Casi todos los elementos genéticos que codifican una transcriptasa inversa lo hacen en pequeñas cantidades, y como parte de una poliproteína.) Esa proteína también tiene que ser procesada, primero para separarla de las proteínas *gag*, y después el gen *pol* codifica por sí mismo la transcriptasa inversa y una proteína integrasa que interviene en la integración del DNA (y que también queda empaquetada en el virión). Para que se traduzca el gen *env*, el mRNA es procesado en toda su longitud, tal como muestra. Obsérvese entonces que, desde el punto de vista del gen *env*, ¡la región *gag* y *pol* es un intrón! El producto *env* es procesado en dos proteínas de la envoltura.

Aunque este patrón puede parecer complejo, es el de un retrovirus «simple». El genoma del virus 1 de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) es bastante complejo e incluye más genes de pequeño tamaño. En su expresión, además de un extenso procesado proteínico que llevan a cabo las proteasas, intervienen patrones complejos de división alternativa de intrones. Sin embargo, en todos estos virus, buena parte de la actividad de la proteasa es para formar proteínas maduras. Por esta razón, se están utilizando inhibidores específicos de la proteasa en el tratamiento de las infecciones retrovíricas, entre ellas las de VIH-1.

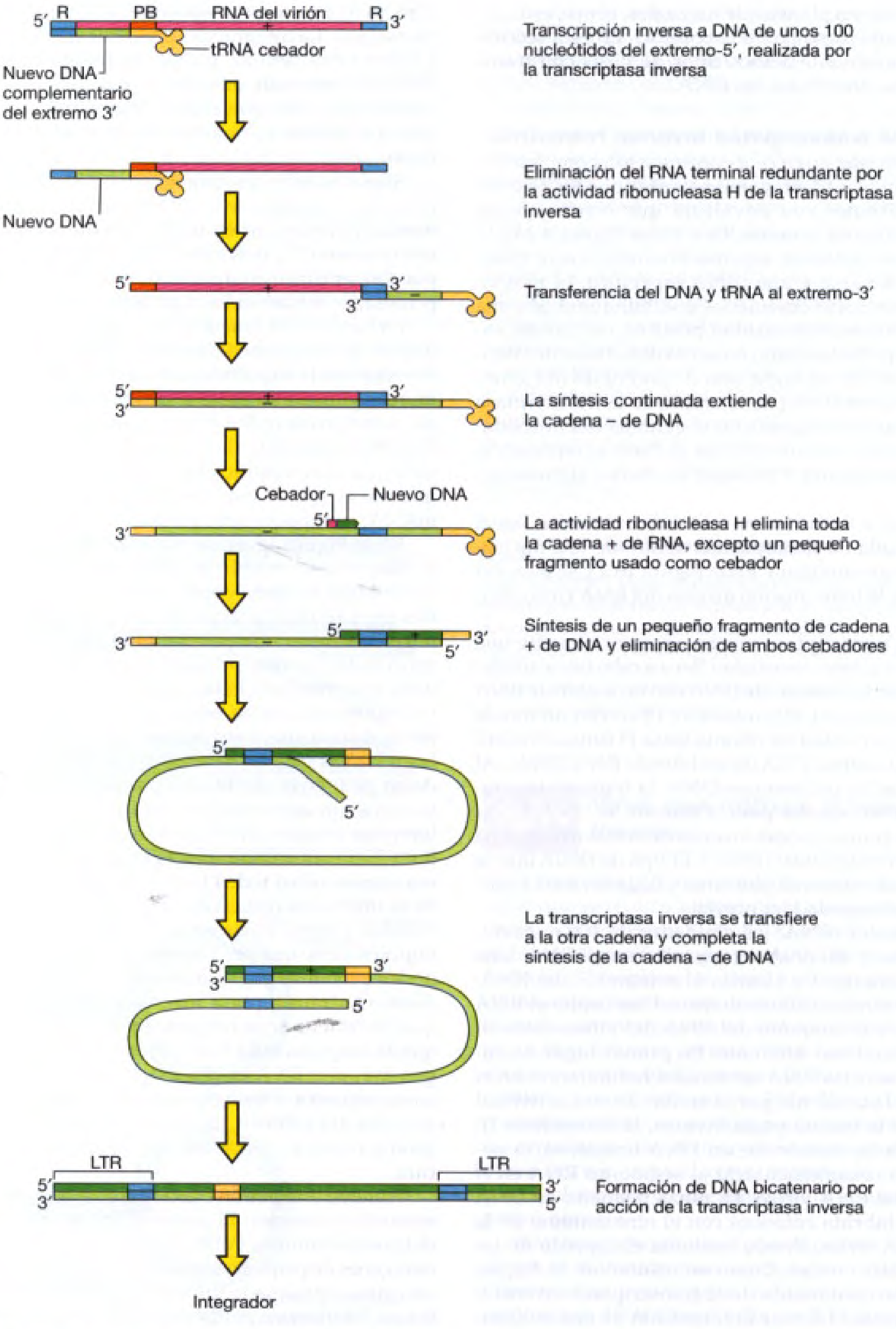

5′ R
PB
RNA del virión
R 3′
tRNA cebador
Nuevo DNA complementario del extremo 3′
Transcripción inversa a DNA de unos 100 nucleótidos del extremo-5′, realizada por la transcriptasa inversa
Nuevo DNA
Eliminación del RNA terminal redundante por la actividad ribonucleasa H de la transcriptasa inversa
5′
3′
3′
Transferencia del DNA y tRNA al extremo-3′
5′
3′
3′
La síntesis continuada extiende la cadena – de DNA
Cebador
Nuevo DNA
5′
3′
La actividad ribonucleasa H elimina toda la cadena + de RNA, excepto un pequeño fragmento usado como cebador
5′
3′
3′
5′
Síntesis de un pequeño fragmento de cadena + de DNA y eliminación de ambos cebadores
5′
5′
La transcriptasa inversa se transfiere a la otra cadena y completa la síntesis de la cadena – de DNA
5′
3′
3′
5′
LTR
LTR
5′
3′
3′
5′
Formación de DNA bicatenario por acción de la transcriptasa inversa
Integrador

Figura 16.23 Etapas generales en la formación de DNA bicatenario a partir del RNA unicatenario de un retrovirus. Las secuencias designadas como R son repeticiones directas en cada uno de los extremos. La secuencia indicada como PB es la zona de unión del cebador (tRNA). Nótese que el proceso de síntesis de DNA origina repeticiones directas del DNA más largas que en el RNA original. Estas secuencias se denominan *repeticiones terminales largas (LTRs)*.

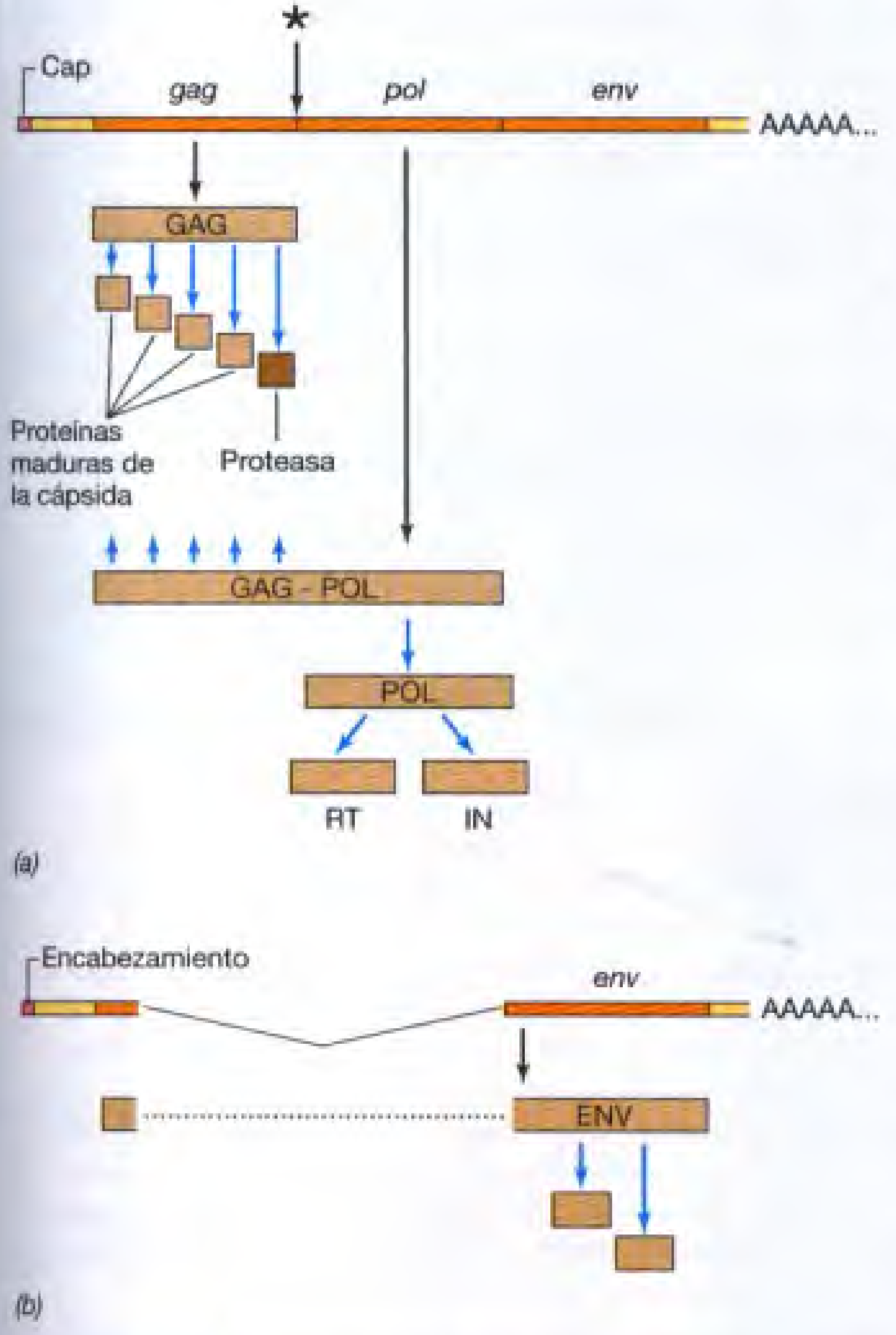


Figura 16.24 Traducción del mRNA de un retrovirus y procesado de las proteínas. (a) Se muestra el mRNA entero, con los tres genes *gag*, *pol* y *env*. El asterisco indica dónde un ribosoma debe leer a través de un codón de parada o experimentar un cambio preciso en la fase de lectura para sintetizar la proteína GAG-POL. Las flechas negras indican traducción, mientras que las azules indican procesado de proteínas. Uno de los productos génicos de *gag* es una proteasa. El producto POL es procesado, dando transcriptasa inversa (RT) e integrasa (IN). (b) El mRNA ha sido procesado, eliminando la mayor parte de la región *gag-pol*. Este mensaje acortado se traduce dando la proteína ENV que, a su vez, es escindida en dos proteínas de la cubierta.

Virus con DNA de transcripción inversa: hepadnavirus

El ciclo vital de los virus comprende una variedad de estructuras genómicas y de transferencia de información que sobrepasa las expectativas. De todo ello son un buen ejemplo los hepadnavirus, entre los que se encuentra el virus de la hepatitis B. El genoma de estos virus que, como objeto de estudio son un reto apasionante, es de los más pequeños que se conocen, pero su ciclo vital es de una gran complejidad. Se sirven, al igual que los retrovirus, de la transcriptasa inversa. El genoma del virión de los hepadnavirus es DNA, pero se replica por medio de un intermediario de *RNA*, al contrario de lo que ocurre con los retrovirus.

El DNA genómico de los hepadnavirus es sólo parcialmente unicatenario (Figura 16.25). Una cadena está incompleta, y las dos cadenas tienen roturas o huecos («gaps»), aunque mantienen la forma circular mediante puentes de hidrógeno. Al entrar en el citoplasma, una polimerasa vírica que lleva el virión completa la replicación de esta molécula. (Esta polimerasa es una proteína con diversas actividades; contiene actividad DNA polimerasa y transcriptasa inversa y es el cebador proteico para la síntesis de una de las cadenas DNA.) La figura que muestra el mapa genético indica la increíble compactación del genoma. A pesar del pequeño tamaño (un promedio de 3200 pares de bases), el genoma codifica varias proteínas. ¡No sólo los genes se solapan, sino que cada base es parte de un codón para al menos una proteína!

En la replicación de este genoma, la polimerasa RNA del hospedador (en el núcleo) lleva a cabo la transcripción, produciendo un transcrito con repeticiones terminales. (Las repeticiones se producen porque aquí la actividad polimerasa es más débil que cuando actúa alrededor de la molécula circular.) Después, la polimerasa vírica copia esto en el DNA, de forma muy parecida a la replicación de los retrovirus, pero en este caso el DNA queda empaquetado en nuevas partículas víricas.

Hay que remarcar que el virus de la hepatitis B en humanos es un «virus auxiliar» para el *agente delta*. Éste es un «subvirus» que necesita del virus de la hepatitis B para el suministro de las proteínas con las que se fabrica su cubierta. En consecuencia, el agente delta es ¡parásito de un parásito! Tiene un genoma circular de cadena negativa de

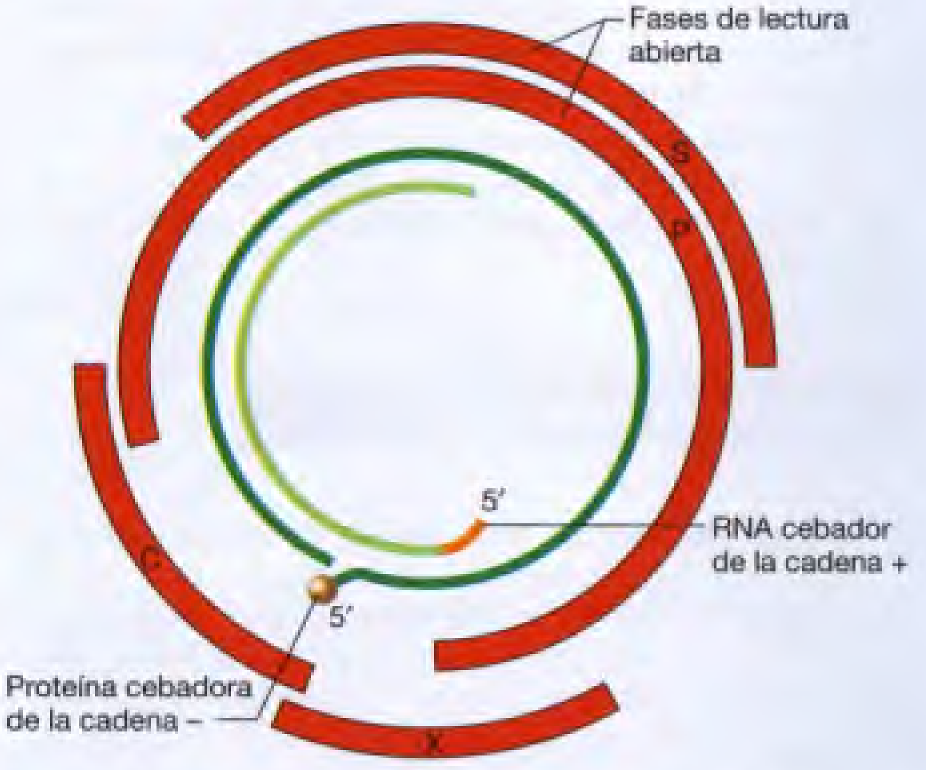


Figura 16.25 El genoma parcialmente bicatenario del virus de la hepatitis B humana se muestra de color verde. Nótese que la cadena positiva no está completa. Se muestran también los tamaños relativos de las fases de lectura abierta C, P, S y X. Puede observarse que todos estos genes se superponen y que pueden usar todas y cada una de las bases del genoma.

1679 bases. Al igual que los viroides (*véase* Sección 9.13) parece capaz de efectuar apareamiento de bases en una estructura en forma de bastón que la RNA polimerasa del hospedador puede transcribir. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con los viroides, el transcrito del agente delta codifica al menos una proteína, que está unida al RNA que lleva el virión del agente delta. Algo que cuesta creer es que el RNA es también una ribozima (*véase* Sección 7.12) que puede escindirse por sí misma. Esta autoescisión podría estar relacionada con la formación de mRNA.

Está claro que los «virus» extremadamente pequeños presentan un gran interés. Los hepadnavirus y el agente delta emplean estrategias diferentes para maximizar la información genética que portan en sus diminutos genomas.

✓ 16.14 Revisión de conceptos

Los retrovirus contienen genomas RNA en el virión, pero usan transcriptasa inversa para obtener una copia del DNA durante su ciclo vital. Los hepadnavirus contienen genomas DNA en su virión, pero usan transcriptasa inversa para fabricar este DNA a partir de una copia RNA. Los patrones de expresión génica para ambos tipos de virus son complejos.

- ✓ ¿Por qué los inhibidores de la proteasa deberían ser efectivos en la limitación de la multiplicación de retrovirus?
- ✓ Descríbanse las diferentes moléculas que emplean los retrovirus y los hepadnavirus como cebadores en la síntesis de DNA.

Preguntas de repaso

1. Descríbanse los tipos de genomas que se encuentran en los virus. Dese un ejemplo de al menos un virus (o grupo de virus) con cada tipo de genoma.
2. ¿Qué son los genes *solapados*? Ejemplos de virus con este tipo de genes.
3. Los virus de cadena RNA positiva son conocidos en el dominio *Bacteria*, en plantas y en animales. ¿Qué características importantes se pueden distinguir entre la expresión génica en estos virus, en especial los que infectan *Bacteria*, y los que infectan eucariotas?
4. La Figura 16.17 muestra un DNA circular que tiene una longitud de 1,5 µm. ¿Cuántos pares de bases hay en esta molécula de DNA (*véase* Sección 7.2)?
5. Muchos bacteriófagos tienen genomas DNA bicatenario. ¿Cómo se transcriben y se traducen los genes que llevan estos virus?
6. Un extremo del genoma T7 siempre entra en la célula en primer lugar durante la infección. Esto es necesario para que la infección siga su curso. Explíquese la razón.
7. Los rhabdovirus tienen una estructura genómica poco frecuente. ¿Cuál es la naturaleza de su genoma y por qué el virión *tiene* que contener una enzima relacionada con esa replicación?
8. Los virus de *Chlorella* tienen un mecanismo de infección celular que es poco común comparado con los de otros virus de eucariotas. ¿Cómo infectan las células y qué otros tipos de virus usan ese mecanismo?
9. Aunque a los virus animales no se les llama habitualmente atemperados, como se hace con algunos bacteriófagos (*véase* Sección 9.10), algunos pueden dar lugar a infecciones latentes. Descríbase dos clases cualquiera de estos tipos de virus animales
10. Muchos virus con DNA bicatenario tienen genomas lineales. Descríbase para tres virus de este tipo el mecanismo que usan para asegurar que los extremos 5′ de sus cadenas DNA puedan replicarse (*véase* Sección 7.7).
11. ¿Qué se puede decir sobre la expresión de genes retrovirales que pueden hacer que la replicación vírica sea sensible a inhibidores de la proteasa?

Ejercicios prácticos

1. Explíquese por qué no todas las proteínas del genoma RNA del bacteriofago MS2 están presentes en la misma cantidad. Una de las proteínas funciona como represora (*véase* Sección 8.5), pero en el nivel de traducción. ¿De qué proteína se trata y cuál es su función?
2. La mayoría de virus que infectan plantas multicelulares son virus RNA. ¿Cuál es la razón?
3. Explíquese el mecanismo por el que los genomas de virus RNA bicatenarios pueden estar segmentados.
4. En algunos virus, por ejemplo los adenovirus, el mecanismo de replicación de ambas cadenas de DNA es continuo. Explíquese cómo puede ser así sin violar la «regla» descrita en el Capítulo 7 que dice que toda síntesis de DNA tiene lugar en la dirección 5′ → 3′.
5. La mayoría de elementos genéticos que expresan la transcriptasa inversa lo hacen en pequeñas cantidades y/o como parte de una poliproteína. ¿Hay alguna razón para ello?

Los procariotas tienen no sólo una enorme diversidad genética, sino también una enorme diversidad metabólica. En conjunto, los procariotas pueden llevar a cabo todas las reacciones metabólicas típicas de los eucariotas. Pero, además, las capacidades metabólicas de algunos procariotas exceden con mucho las posibilidades de los eucariotas. Tenemos, por ejemplo, la capacidad de conservar energía obtenida a partir de reacciones químicas desarrolladas en condiciones anóxicas (libres de oxígeno), a partir de reacciones en las que intervienen diversos compuestos inorgánicos, como los que se mencionan a continuación con organismos que oxidan hierro reducido a óxidos de hierro, y a partir de una lista prácticamente inacabable de compuestos orgánicos que no pueden utilizar los organismos superiores. Sin duda, en lo referente a la diversidad metabólica, los procariotas han explotado cualquier medio concebible de vivir que sea acorde con las leyes de la termodinámica.

17

DIVERSIDAD METABÓLICA

I EL SISTEMA DE VIDA FOTOTRÓFICO 541
17.1 Fotosíntesis 541
17.2 Función de la clorofila y de la bacterioclorofila en la fotosíntesis 542
17.3 Carotenoides y ficobilinas 545
17.4 Fotosíntesis anoxigénica 548
17.5 Fotosíntesis oxigénica 552
17.6 Fijación autotrófica de CO_2: el ciclo de Calvin 555
17.7 Fijación autotrófica de CO_2: ciclo inverso del ácido cítrico y ciclo del hidroxipropionato 556

II QUIMIOLITOTROFIA: ENERGÍA A PARTIR DE LA OXIDACIÓN DE DONADORES DE ELECTRONES INORGÁNICOS 557
17.8 Donadores inorgánicos de electrones y energética 558
17.9 Oxidación del hidrógeno 559
17.10 Oxidación de compuestos reducidos del azufre 560
17.11 Oxidación del hierro 563
17.12 Nitrificación y anamox 565

III EL SISTEMA DE VIDA ANAERÓBICO 568
17.13 Respiración anaeróbica 568
17.14 Reducción de nitrato y proceso de desnitrificación 569
17.15 Reducción de sulfato 571
17.16 Acetogénesis 573
17.17 Metanogénesis 575
17.18 Hierro férrico, manganeso, clorato y aceptores orgánicos de electrones 579
17.19 Fermentaciones: consideraciones energéticas y redox 582

17.20 Diversidad fermentativa 585
17.21 Sintrofia 587

IV OXIDACIÓN DE HIDROCARBUROS Y PAPEL DEL O_2 EN EL CATABOLISMO DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS 589

17.22 El oxígeno molecular (O_2) como reactante en procesos bioquímicos 589
17.23 Oxidación de hidrocarburos 589
17.24 Metanotrofia y metilotrofia 590
17.25 Utilización de hexosas, pentosas y polisacáridos 593
17.26 Metabolismo de los ácidos orgánicos 595
17.27 Los lípidos como nutrientes microbianos 596

V FIJACIÓN DEL NITRÓGENO 598

17.28 La nitrogenasa y el proceso de fijación de nitrógeno 598
17.29 Genética y regulación de la fijación de N_2 601

Glosario

Acetogénesis (homoacetogénesis) metabolismo energético con producción de acetato, bien a partir de H_2 más CO_2, bien a partir de compuestos orgánicos

Aeróbico metabolismo, célula u organismo que funciona con oxígeno (se aplica principalmente en relación con un ser vivo). (*Véase* óxico)

Anamox oxidación anóxica de amoníaco

Anaeróbico metabolismo, célula u organismo que funciona sin la intervención del oxígeno (se aplica principalmente en relación con un ser vivo.) (*Véase* anóxico)

Anóxico sin oxígeno (se aplica principalmente a un medio de cultivo, hábitat o ambiente)

Antena referido a los fotocomplejos y moléculas de pigmento captadoras de luz que envían energía a los centros de reacción

Autotrofia utilización de CO_2 como única fuente de carbono

Bacterioclorofila pigmento clorofílico de los fototrofos anoxigénicos

Carotenoides pigmentos hidrofóbicos accesorios presentes en las membranas fotosintéticas junto con la clorofila

Centro de reacción complejo fotosintético que contiene clorofila (o bacterioclorofila) y otros componentes, dentro del cual se producen las reacciones iniciales de transferencia de electrones en la fotosíntesis

Ciclo de Calvin vía bioquímica de fijación de CO_2 en muchos organismos autotrofos

Clorofila porfirina con Mg de los organismos fotosintéticos, sensible a la luz, que inicia el proceso de fotofosforilación

Clorosoma estructuras de forma elipsoidal presentes en la periferia de las células de las bacterias verdes del azufre y verdes no del azufre, que contienen bacterioclorofilas antena (*c*, *d* o *e*)

Decloración reductora respiración aeróbica en la que se usa un compuesto orgánico clorinado como aceptor de electrones, generalmente con liberación de Cl^-

Desnitrificación respiración anaeróbica en la que el NO_3^- se reduce a compuestos nitrogenados gaseosos, fundamentalmente N_2

Desproporción desdoblamiento de un compuesto en dos nuevos compuestos, uno más oxidado y otro más reducido que el compuesto original

Dioxigenasa enzima que cataliza la incorporación de los dos átomos del O_2 en un sustrato

Fermentación catabolismo anaeróbico de un compuesto orgánico donde el compuesto actúa tanto de donador como de aceptor de electrones y el ATP se produce por fosforilación a nivel de sustrato

Ficobiliproteína complejo pigmentario accesorio de las cianobacterias que contiene una molécula de ficocianina o ficoeritrina acoplada a proteínas

Fijación de nitrógeno reducción biológica de N_2 a NH_3 por la nitrogenasa

Fotofosforilación producción de ATP en la fotosíntesis

Fotofosforilación cíclica reacciones de síntesis de ATP energizadas por la luz en los organismos fototrofos, donde los electrones se desplazan en un ciclo cerrado, estableciendo una fuerza protón motriz

Fotosíntesis serie de reacciones en las que se produce la síntesis de ATP por reacciones energizadas por la luz y la fijación de CO_2 dando material celular

Fotosíntesis anoxigénica fotosíntesis que no produce O_2

Fotosíntesis oxigénica fotosíntesis realizada por cianobacterias, algas y plantas verdes en las que se produce O_2

Fototrofo organismo capaz de usar la luz como fuente de energía

Hidrogenasa enzima capaz de añadir o quitar H_2, ampliamente distribuida entre los microorganismos anaerobios

Metanogénesis producción biológica de metano (CH_4)

Metanotrofia nutrición a partir de la oxidación de metano

Metilotrofia metabolismo energético en el que grupos metilo o el metano son oxidados como donadores de electrones

Mixotrófico estado nutricional en el que un compuesto inorgánico sirve como fuente de energía (donador de electrones) y uno o varios compuestos orgánicos sirven como fuente de carbono

Monooxigenasa enzima que cataliza la incorporación de un átomo del O_2 en un sustrato, mientras que el otro átomo se reduce a H_2O

Nitrificación conversión microbiana de NH_3 a NO_3^-

Nitrogenasa enzima capaz de reducir N_2 a NH_3 en el proceso de fijación del nitrógeno

Óxico con oxígeno (se aplica principalmente a un medio de cultivo, hábitat o ambiente)

Quimiolitotrofo microorganismo capaz de oxidar compuestos inogánicos como fuente de energía

Recalcitrante resistente al ataque microbiano

Respiración anaeróbica respiración en la que alguna sustancia como SO_4^{2-} o NO_3^- sirve como aceptor terminal de electrones en vez de O_2

Sintrofia proceso en el cual dos o más microorganismos cooperan en la degradación de una sustancia que no pueden degradar por sí solos

Tilacoides sistemas de sacos membranosos fotosintéticos presentes en el citoplasma de las cianobacterias y en los cloroplastos

Transporte inverso de electrones movimiento de electrones, con consumo de energía, contra el gradiente termodinámico, produciendo un reductor fuerte a partir de un donador de electrones débil

En la unidad anterior hemos considerado la gran diversidad filogenética de la vida microbiana en la Tierra. En este capítulo trataremos la *diversidad metabólica* de estos organismos, con especial énfasis en los procesos bioquímicos que determinan esa diversidad. Entraremos a continuación a estudiar la ecología microbiana: las interacciones entre los microorganismos y con su ambiente. La diversidad metabólica y la ecología microbiana avanzan codo con codo; la diversidad metabólica que se describe en este capítulo es la base de los ciclos de nutrientes y de otras actividades microbianas esenciales que se tratarán en los Capítulos 18 y 19. Tal como podremos ver, los microorganismos y sus reacciones metabólicas desempeñan funciones clave en el mantenimiento del entramado de la vida en la Tierra y son de crucial importancia en la agricultura y en otros aspectos del quehacer humano.

I EL SISTEMA DE VIDA FOTOTRÓFICO

La **fototrofia**, utilización de la luz como fuente de energía, está ampliamente distribuida en el mundo microbiano. En las cinco primeras secciones vamos a tratar las principales formas de fototrofia, entre ellas la que produce el oxígeno que respiramos, para ver después cómo la mayoría de fototrofos satisfacen todas sus necesidades de carbono a partir del CO_2.

17.1 Fotosíntesis

Uno de los procesos biológicos más importantes en la Tierra es la **fotosíntesis**, la conversión de la energía luminosa en energía química. Los organismos que realizan la fotosíntesis se llaman *fototrofos* (Figura 17.1). La mayor parte de los organismos fototróficos son también *autotrofos*, es decir, capaces de crecer con CO_2 como única fuente de carbono. La energía de la luz se usa entonces en la reducción del CO_2 a compuestos orgánicos.

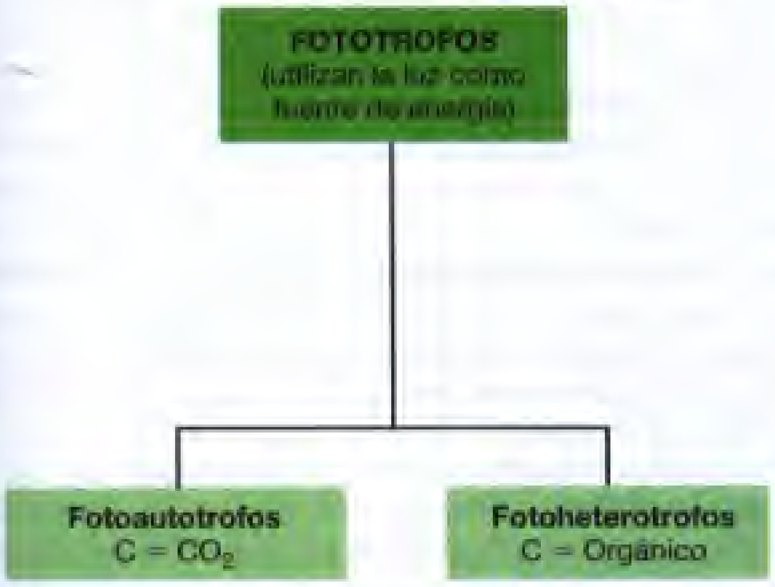


Figura 17.1 Clasificación de los organismos fototrofos en relación con la fuente de energía y de carbono.

Hay también algunos fototrofos que utilizan la luz como fuente de energía, pero que usan carbono orgánico como fuente de carbono; representan un estilo de vida denominado *fotoheterotrofia* (Figura 17.1). La capacidad de realizar fotosíntesis depende de la presencia de pigmentos fotosensibles, las *clorofilas*, que se encuentran en las plantas, algas y algunas bacterias. La luz llega a los organismos fototróficos en unidades concretas de energía llamadas *cuantos*. La absorción de cuantos de luz por las clorofilas inicia el proceso de conversión de energía por fotosíntesis.

Reacciones de la fase luminosa y de la fase oscura

Se puede considerar que el crecimiento de un fotoautotrofo se caracteriza por dos tipos distintos de reacciones: las reacciones de la **fase luminosa**, por las que la energía de la luz se conserva como energía química, y las reacciones de la **fase oscura**, en las que esa energía química se usa para reducir el CO_2 a compuestos orgánicos. En el crecimiento autotrófico la energía se produce en forma de trifosfato de adenosina (ATP), mientras que los electrones para la reducción de CO_2 proceden del NADH o del NADPH*. Estos últimos son producidos por la reducción de NAD^+ o $NADP^+$ mediante electrones que se originan en una variedad de donadores que se comentará más adelante.

Las reacciones de la fase luminosa, por tanto, conservan una parte de la energía contenida en la luz en una forma química, ATP, que las células utilizan. Para impulsar las reacciones autotróficas, algunas bacterias fototróficas obtienen poder reductor de los donadores de electrones de su ambiente, generalmente fuentes de azufre reducido (H_2S, S^0, $S_2O_3^{2-}$) o H_2. Por el contrario, las plantas verdes, las algas y las cianobacterias usan H_2O, por sí mismo un donador de electrones débil (*véase* Figura 5.9), como fuente de poder reductor para reducir $NADP^+$ a NADPH, produciendo oxígeno molecular, O_2, como subproducto (Figura 17.2). Puesto que hay producción de O_2, la fotosíntesis en estos organismos recibe el nombre de **oxigénica**. En otras bacterias fototróficas, donde no hay producción de O_2, el proceso se denomina fotosíntesis **anoxigénica**. Veremos más adelante que en tanto que la producción de NADH a partir de sustancias como el H_2S por los fototrofos anoxigénicos puede o no ser realizado directamente por la fase luminosa, la oxidación de H_2O a O_2 por los fototrofos oxigénicos sí lo es (Figura 17.2); en consecuencia, estos organismos necesitan luz *tanto* para obtener poder reductor *como* para la conservación de energía.

✓ 17.1 Revisión de conceptos

Se conocen dos clases de metabolismo energético: los *fototrofos* obtienen energía de la luz, en tanto que la energía de los *quimiotrofos* proviene de fuentes químicas. La fotosíntesis está constituida por reacciones luminosas, donde se genera el ATP, y por reacciones oscuras, donde hay consumo de ATP para la fijación del CO_2.

---

* En los fototrofos oxigénicos, la sustancia reducida es NADPH, mientras que en los anoxigénicos es NADH.

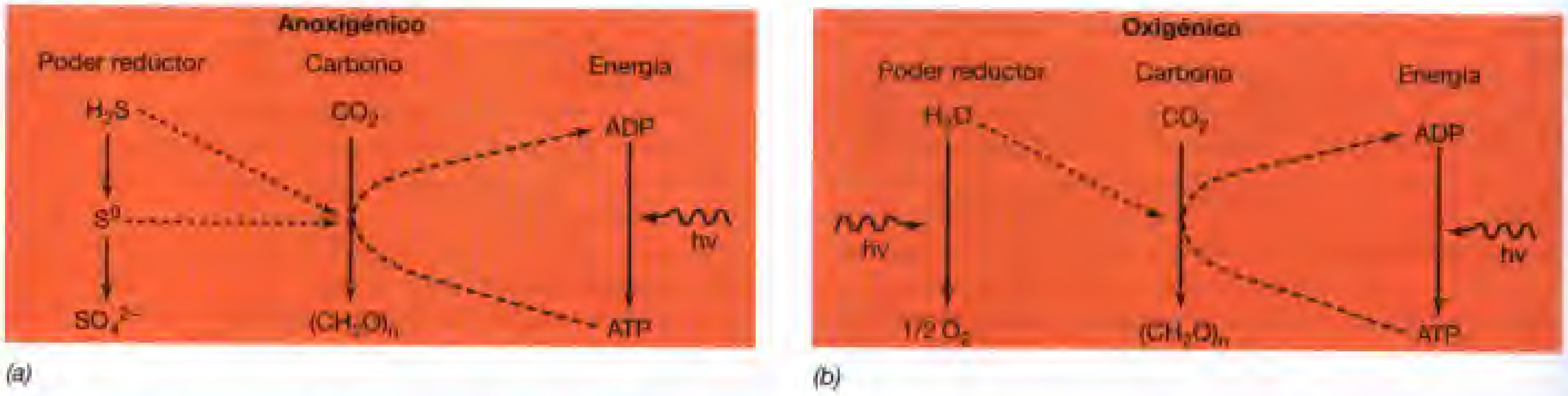


Figura 17.2 Producción de energía y poder reductor en los organismos fototrofos (a) anoxigénicos, en comparación con (b) los fototrofos oxigénicos. Aunque ambos tipos de fototrofos obtienen su energía de la luz (hv), en los oxigénicos la luz causa también la oxidación de agua a oxígeno.

- ✓ ¿En qué son similares los organismos *fotoautotrofos* y los *fotoheterotrofos* y en qué son diferentes?
- ✓ ¿Cuál es la diferencia fundamental entre un fototrofo *oxigénico* y otro *anoxigénico*?

17.2 Función de la clorofila y de la bacterioclorofila en la fotosíntesis

La fotosíntesis sólo se produce en organismos que poseen algún tipo de **clorofila.** La clorofila es una porfirina, como los citocromos (*véase* Sección 5.11), pero, a diferencia de éstos, las clorofilas contienen un átomo de *magnesio*, en vez de un átomo de hierro, en el centro del anillo de porfirina. La clorofila también contiene radicales específicos unidos al anillo de porfirina, así como una molécula de alcohol de cadena lateral hidrofóbica. Esa cadena lateral permite la asociación de la clorofila con lípidos y proteínas hidrofóbicas de las membranas fotosintéticas.

La estructura de la clorofila *a*, que es la clorofila principal de las plantas superiores, la mayor parte de las algas y las cianobacterias, se muestra en la Figura 17.3. La clorofila *a* es de color verde porque *absorbe* con preferencia la luz roja y la azul y *transmite* la luz verde. En la Sección 10.3 se mencionó el espectro electromagnético. Las propiedades de un pigmento se expresan por su *espectro de absorción*, que indica el grado en el que el pigmento absorbe luz de diferentes longitudes de onda. El espectro de absorción de células que contienen clorofila *a* muestra una fuerte absorción de la luz roja (absorción máxima a una longitud de onda de 680 nm) y de la luz azul (máxima a 430 nm) (Figura 17.3*a*).

Existen varias clorofilas distintas que se distinguen por sus diferentes espectros de absorción. La clorofila *b*, por ejemplo, tiene una absorción máxima a 660 nm, en vez de a 680 nm. Muchas plantas tienen más de una clorofila, pero las más comunes son la *a* y la *b*. Entre los procariotas, las cianobacterias tienen clorofila *a*, pero los fototrofos anoxigénicos, como las bacterias rojas y las verdes, pueden tener diversas bacterioclorofilas (Figuras 17.3 y 17.4). La bacterioclorofila *a* (Figura 17.3*b*), presente en la mayoría de bacterias rojas (*véase* Sección 12.2), tiene su máximo de absorción entre 800 y 925 nm, dependiendo de la especie. Diferentes especies presentan distintas proteínas asociadas a pigmentos y la absorción máxima de la bacterioclorofila *a* depende hasta cierto punto de la naturaleza de esas proteínas y de la forma en que se ordenan en fotocomplejos. Otras bacterioclorofilas, presentes en diversas líneas filogenéticas, absorben en otras regiones del espectro visible e infrarrojo (Figura 17.4).

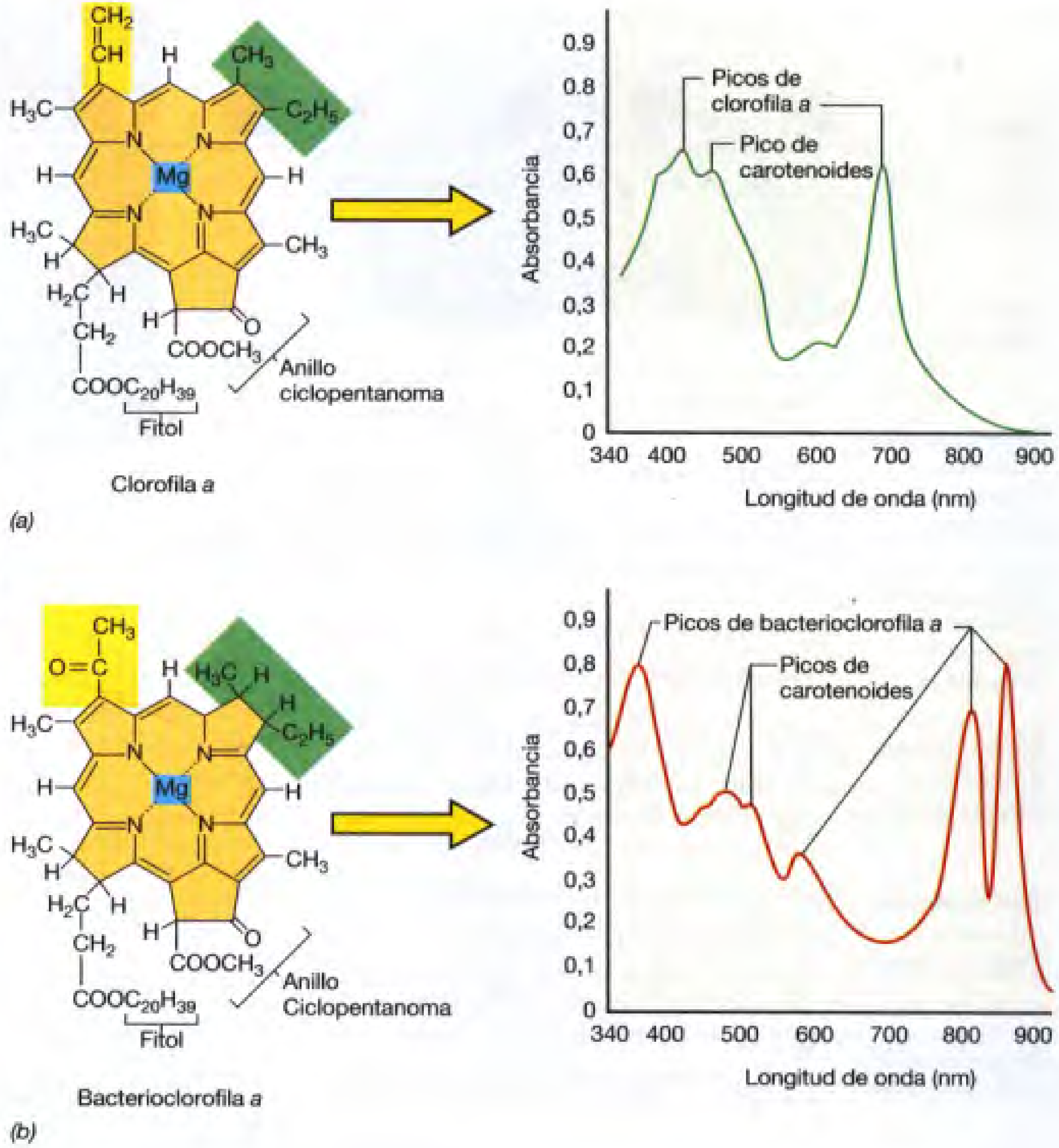
¿Por qué los organismos tienen varias clases de clorofila que absorben luz a diferentes longitudes de onda? Una razón podría ser el mejor uso de la energía del espectro electromagnético. Sólo la energía de luz que se *absorbe* puede usarse para producir energía; al tener diferentes pigmentos, dos microorganismos no relacionados pueden coexistir en un mismo hábitat, donde cada uno usa longitudes de onda que el otro no utiliza. Por tanto, la diversidad en la pigmentación tiene significado ecológico.

Membranas fotosintéticas y cloroplastos

Los pigmentos clorofílicos y todos los demás componentes del aparato captador de luz se encuentran en el interior de la célula, dentro de sistemas de membrana especiales, las **membranas fotosintéticas.** Su localización en la célula es diferente en los microorganismos procariotas y en los eucariotas. En los eucariotas, la fotosíntesis está asociada con orgánulos intracelulares especiales, los **cloroplastos** (Figura 17.5*a*) (*véase* Sección 14.3). Los pigmentos clorofílicos se fijan a estructuras membranosas lamelares del cloroplasto (17.5*b*). Estos sistemas membranosos se denominan **tilacoides**. Los tilacoides apilados forman los *grana* (Figura 17.5*b*). Los tilacoides se disponen de tal modo que el cloroplasto queda dividido en dos regiones, la matriz que los rodea y el espacio interior dentro de las capas de tilacoides (Figura 17.5*b*). Esta disposición permite el desarrollo de un gradiente electroquímico de protones con energía de la luz que puede usarse para sintetizar ATP, como se describirá más adelante en la Sección 17.5.

No existen cloroplastos en los procariotas y los pigmentos fotosintéticos están integrados en sistemas de membrana internos que se forman (1) por invaginación de la membrana citoplasmática (bacterias rojas) (*véase*, por ejemplo, Figura 12.2*a* y *b*; *véase* también Figura 17.12), (2) por la membrana citoplasmática misma (heliobacterias)

Figura 17.3 Estructura de la clorofila *a* y de la bacterioclorofila *a*, (las dos son tetrapirroles con magnesio). Las dos moléculas son idénticas excepto en las porciones señaladas en amarillo y verde. El átomo central de Mg se indica en color azul. El espectro de absorción correspondiente a cada molécula es el siguiente: (a) células del alga verde *Chlamydomonas* (*véase* Sección 4.11). Los picos a 680 y 430 nm se deben a la clorofila *a*; el pico a 480 nm se debe a los carotenoides; (b) células de la bacteria roja fototrófica *Rhodopseudomonas palustris* (*véase* Sección 12.2). Los picos a 870, 800, 590 y 360 nm se deben a la bacterioclorofila *a*, mientras que los picos a 525 y 475 nm se deben a los carotenoides. Obsérvese que en la bacterioclorofila *a*, el anillo II está *reducido* con respecto al de la clorofila *a*.


CH2
CH
H
CH3
H3C
C2H5
N
Mg
H
H3C
CH3
H2C
H
CH2
COOCH3
O
Anillo ciclopentanoma
COOC20H39
Fitol
Clorofila a
(a)
Picos de clorofila a
Pico de carotenoides
Absorbancia
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0.8
0.9
340
400
500
600
700
800
900
Longitud de onda (nm)
CH3
O=C
H3C
H
Anillo Ciclopentanoma
Bacterioclorofila a
(b)
Picos de bacterioclorofila a
Picos de carotenoides

(*véase* Sección 12.20), (3) tanto por la membrana citoplasmática como por estructuras especializadas rodeadas por membranas no unitarias llamadas *clorosomas* (bacterias verdes) (*véase* Figura 17.7), o (4) en membranas de tilacoides en las cianobacterias.

Centros de reacción y pigmentos antena

Dentro de una membrana fotosintética, las moléculas de clorofila o bacterioclorofila se asocian con proteínas en complejos que contienen de 50 a 300 moléculas (Figura 17.6). Pero sólo un número muy reducido de estas moléculas participan directamente en la conversión de la energía luminosa en ATP —se trata de las clorofilas o bacterioclorofilas de **los centros de reacción** (Figura 17.6)—. Aparecen rodeadas por otras moléculas de clorofila más numerosas que actúan como **captadoras de luz o antenas**. Los pigmentos antena captan la luz y transfieren la energía lumínica al centro de reacción. A las bajas intensidades de luz que suelen darse en la naturaleza, esta ordenación de las moléculas de pigmento permite capturar y utilizar los fotones que de otra forma serían insuficientes por sí mismos para llevar a cabo la fotoquímica de los centros de reacción.

El máximo de eficiencia a baja intensidad de luz se encuentra en el **clorosoma** de las bacterias verdes del azufre y de *Chloroflexus* (Figura 17.7). Esta estructura funciona como un sistema de antena gigante pero, a diferencia de las antenas de las bacterias rojas, las bacterioclorofilas del clorosoma no están asociadas con proteínas. En su lugar, funcionan más bien como un circuito de estado sólido, absorbiendo intensidades extremadamente bajas de luz y transfiriendo la energía a la bacterioclorofila *a* en el centro de reacción localizado en la membrana citoplasmática (Figura 17.7). Esta disposición es altamente eficiente en la absorción de luz a bajas intensidades y, de hecho, se ha com-

Pigmento	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7	Máximo de absorción (nm) *In vivo*	 Extracto (metanol)
Bacterioclorofila *a* (bacterias rojas)	$-\underset{\underset{O}{\Vert}}{C}-CH_3$	$-CH_3{}^{b}$	$-CH_2-CH_3$	$-CH_3$	$-\underset{\underset{O}{\Vert}}{C}-O-CH_3$	P/Gg[a]	—H	805 830-890	771
Bacterioclorofila *b* (bacteria rojas)	$-\underset{\underset{O}{\Vert}}{C}-CH_3$	$-CH_3{}^{c}$	$=\underset{\underset{H}{\vert}}{C}-CH_3$	$-CH_3$	$-\underset{\underset{O}{\Vert}}{C}-O-CH_3$	P	—H	835-850 1020-1040	794
Bacterioclorofila *c* (bacterias verdes del azufre)	$-\overset{\overset{H}{\vert}}{\underset{\underset{OH}{\vert}}{C}}-CH_3$	$-CH_3$	$-C_2H_5$ $-C_3H_7{}^{d}$ $-C_4H_9$	$-C_2H_5$ $-CH_3$	—H	F	$-CH_3$	745-755	660-669
Bacterioclorofila c_s (bacterias verdes no del azufre)	$-\overset{\overset{H}{\vert}}{\underset{\underset{OH}{\vert}}{C}}-CH_3$	$-CH_3$	$-C_2H_5$	$-CH_3$	—H	S	$-CH_3$	740	667
Bacterioclorofila *d* (bacterias verdes del azufre)	$-\overset{\overset{H}{\vert}}{\underset{\underset{OH}{\vert}}{C}}-CH_3$	$-CH_3$	$-C_2H_5$ $-C_3H_7$ $-C_4H_9$	$-C_2H_5$ $-CH_3$	—H	F	—H	705-740	654
Bacterioclorofila *e* (bacterias verdes del azufre)	$-\overset{\overset{H}{\vert}}{\underset{\underset{OH}{\vert}}{C}}-CH_3$	$-\underset{\underset{O}{\Vert}}{C}-H$	$-C_2H_5$ $-C_3H_7$ $-C_4H_9$	$-C_2H_5$	—H	F	$-CH_3$	719-726	646
Bacterioclorofila *g* (heliobacterias)	$-\overset{\overset{H}{\vert}}{C}=CH_2$	$-CH_3{}^{b}$	$-C_2H_5$	$-CH_3$	$-\underset{\underset{O}{\Vert}}{C}-O-CH_3$	F	—H	670-788	765

[a] P, Fitil éster ($C_{20}H_{39}O-$); F, farmesil éster ($C_{15}H_{25}O-$); Gg, geranilgeraniol éster ($C_{10}H_{17}O-$); S, estearil alcohol ($C_{18}H_{37}O-$).

[b] Entre C_3 y C_4 no hay doble enlace; en las posiciones C_3 y C_4 hay átomos adicionales de H.

[c] Entre C_3 y C_4 no hay doble enlace; en la posición C_3 hay un átomo de H adicional.

[d] Las bacterioclorofilas *c*, *d* y *e* son mezclas isoméricas con los diferentes radicales en R_3, tal como se indica.

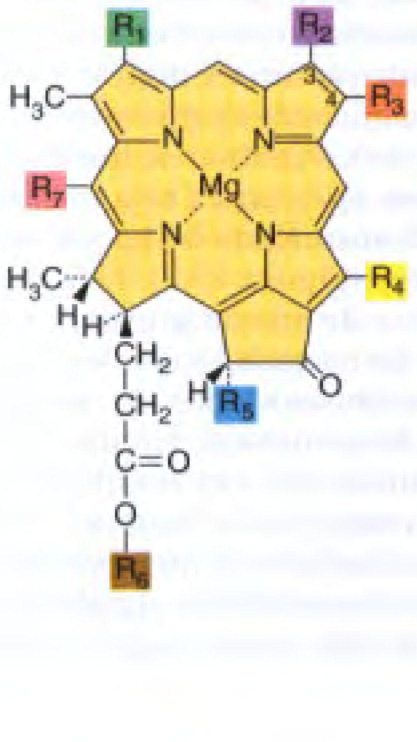


Figura 17.4 Estructura de todas las bacterioclorofilas conocidas. Los diferentes radicales que se encuentran en las posiciones R_1 a R_7 se indican en la tabla que acompaña la figura. Las propiedades de absorción *in vivo* pueden determinarse suspendiendo las células intactas en líquido viscoso, como sacarosa al 60% (esto reduce la dispersión de la luz y tiende a compensar los espectros). La Figura 17.3 indica los distintos espectros de absorción que se dan en cada molécula. La absorción máxima *in vivo* son los picos de absorción de *relevancia fisiológica*. El espectro de los extractos celulares pertenecen a los pigmentos separados de sus proteínas y disueltos en un disolvente orgánico, como el metanol. Los espectros de los extractos celulares revelan las propiedades de absorción de la bacterioclorofila pura, antes de su unión a los fotocomplejos dentro de las membranas (*véanse* Figuras 17.13 y 17.15).

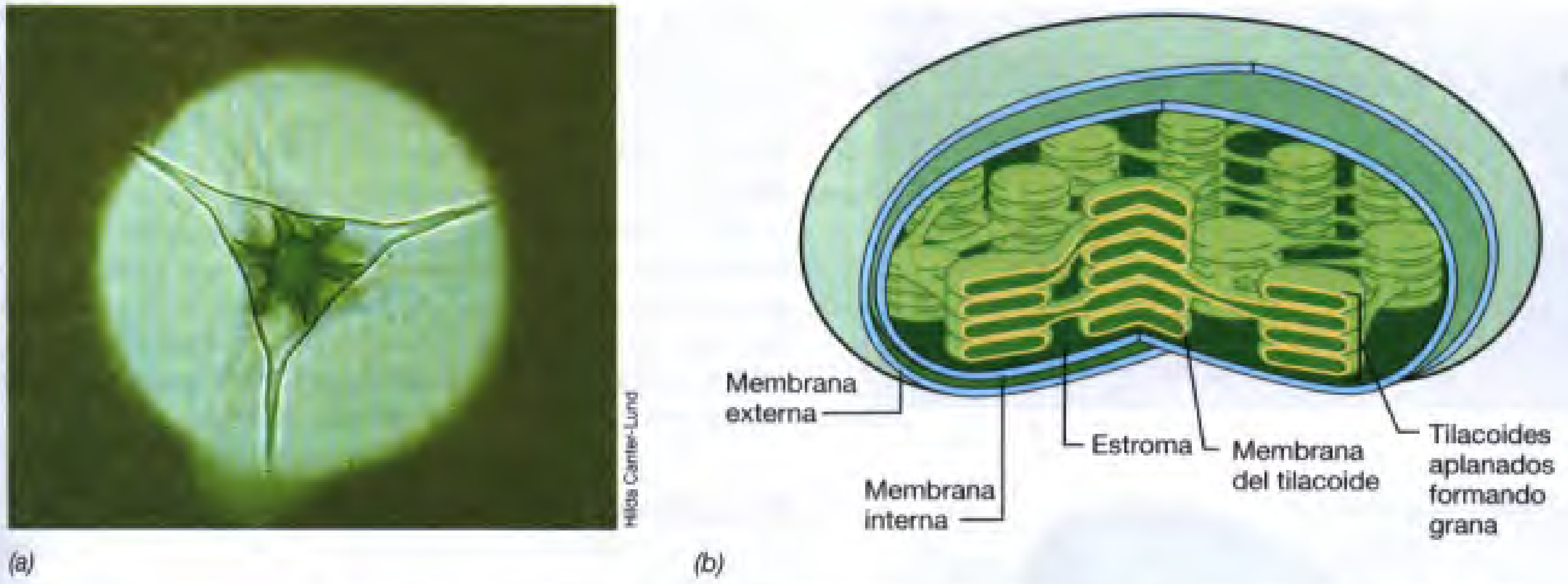


Figura 17.5 El cloroplasto. (a) Micrografía de una célula de un alga mostrando cloroplastos. (b) Detalles de la estructura del cloroplasto para indicar que los repliegues de las membranas del tilacoide definen un espacio interno, llamado estroma, y forman apilamientos membranosos, llamados grana.

probado que las bacterias verdes del azufre pueden crecer a intensidades más bajas de luz que cualquier otro fototrofo conocido.

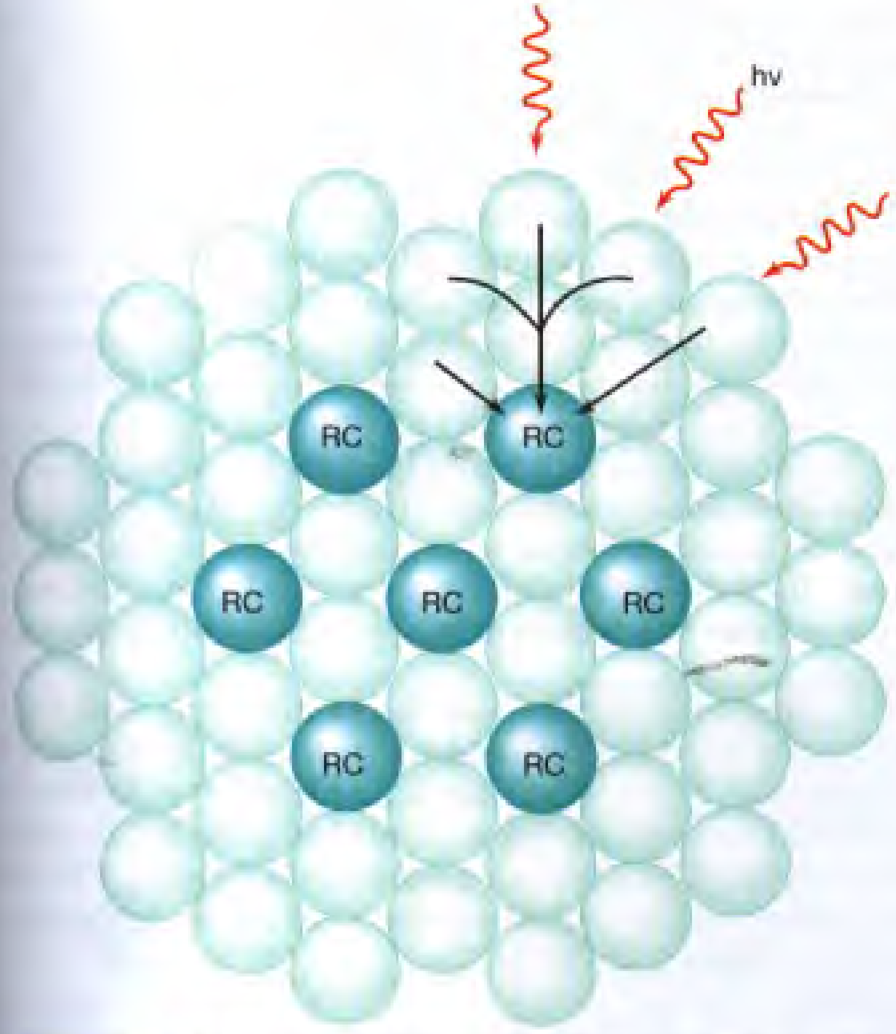


Figura 17.6 Modelo de la reordenación de las clorofilas/bacterioclorofilas captadoras de luz en relación con los centros de reacción dentro de una membrana fotosintética. La energía lumínica absorbida por las moléculas captadoras de luz (verde claro), se transfiere a los centros de reacción (verde oscuro, RC) donde se inician las reacciones de transporte fotosintético de electrones. Todos los pigmentos moleculares se mantienen en su lugar dentro de la membrana gracias a proteínas específicas de unión al pigmento. Compárese con las Figuras 17.13 y 17.15.

✓ 17.2 Revisión de conceptos

El pigmento central en la fotosíntesis es la clorofila (o bacterioclorofila). Las clorofilas se localizan en las membranas fotosintéticas, donde tienen lugar las reacciones luminosas. La función de las moléculas antena de clorofila es captar la energía luminosa y transferirla a las clorofilas del centro de reacción.

- ✓ Teniendo en cuenta su función, ¿por qué es necesario que las clorofilas estén localizadas en membranas?
- ✓ ¿Cuál es la diferencia entre el número de moléculas de clorofila antena y moléculas de clorofila en el *centro de reacción* en una membrana fotosintética? ¿Por qué esa diferencia?
- ✓ ¿Qué pigmentos se encuentran en el interior del *clorosoma*?

17.3 Carotenoides y ficobilinas

Aunque la presencia de clorofila o bacterioclorofila es condición imprescindible para que pueda haber fotosíntesis, los organismos fototrofos tienen diversos pigmentos accesorios que intervienen en la captura y procesado de la energía luminosa. Entre éstos se encuentran los **carotenoides** y las **ficobilinas**. Estos pigmentos desempeñan principalmente una función fotoprotectora (los carotenoides) o de captación de la luz (ficobilinas). A continuación, vamos a considerar cada unos de estos grupos de pigmentos.

Carotenoides

Los pigmentos accesorios más frecuentes son los **carotenoides**, que se encuentran en todos los organismos fototrofos. Los carotenoides son pigmentos hidrofóbicos firmemente insertados en la membrana; la estructura de un carotenoide típico se muestra en la Figura 17.8. Los carotenoides tienen largas cadenas hidrocarbonadas con enlaces sencillos (C—C) y dobles (C═C), alternados en un sistema de dobles enlaces *conjugados*. En general, los carotenoides son de color amarillo, rojo, marrón o verde (*véase* Figu-

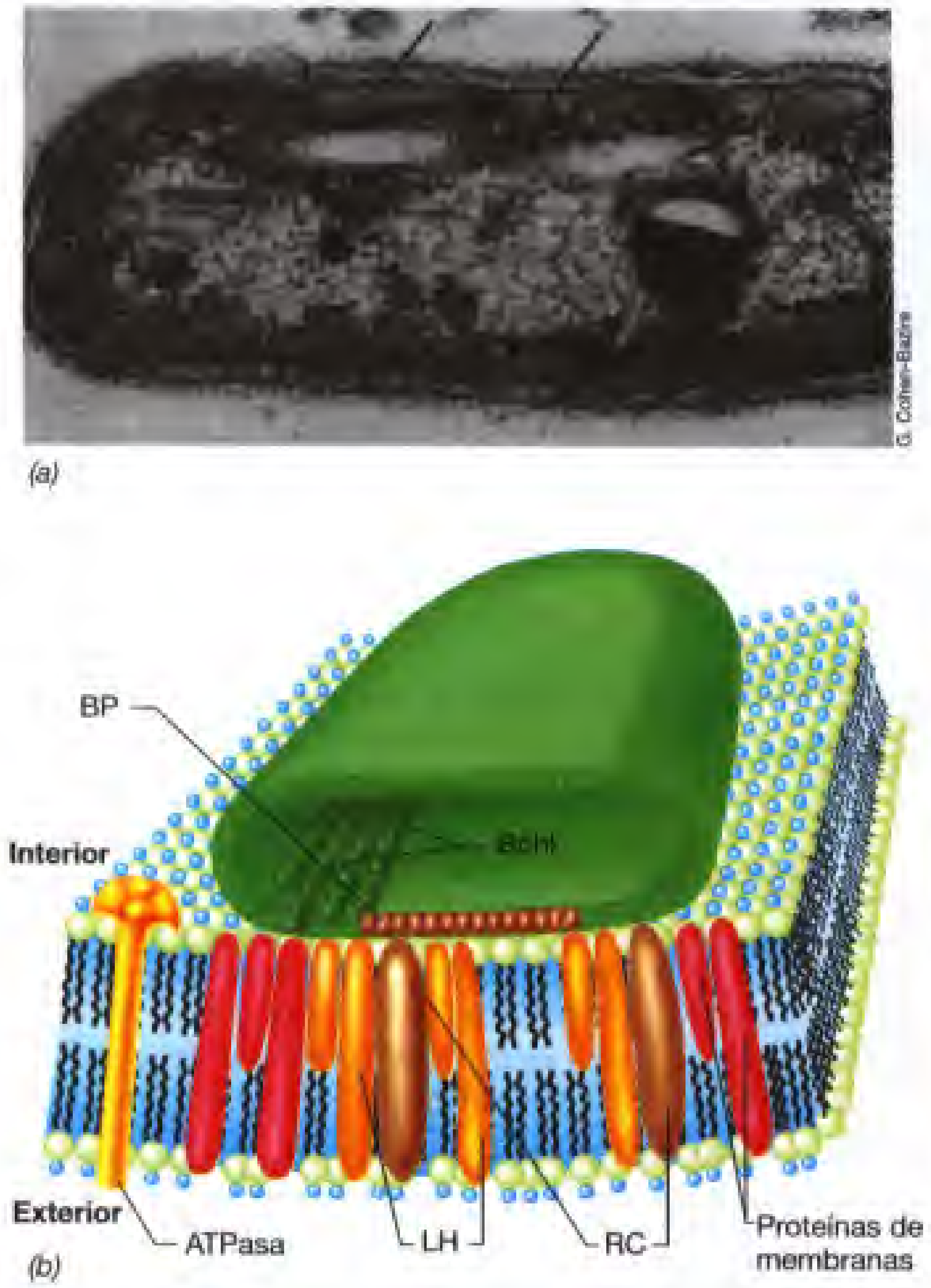


Figura 17.7 Clorosoma de bacterias verdes del azufre y no del azufre. (a) Micrografía electrónica de una célula de *Pelodyctium clathratiforme*, bacteria verde del azufre. Obsérvense los clorosomas (flechas). (b) Modelo de la estructura del clorosoma. El clorosoma (color verde) se asienta sobre la superficie interior de la membrana citoplasmática. Las moléculas de bacterioclorofila (Bchls *c*, *d* o *e*) antena se alinean en forma de tubos en el interior del clorosoma, y la energía se transfiere desde esas bacterioclorofilas a través de las moléculas Bchl *a* captadoras de luz (LH) a la Bchl *a* del centro de reacción (RC) en la membrana citoplasmática (azul). Las proteínas de la placa basal (BP) funcionan como conectoras entre el clorosoma y la membrana citoplasmática.

ra 12.2) y absorben luz en la región azul del espectro (*véase* Figura 17.3). Los tipos y estructuras de los carotenoides de diversos fototrofos están bien estudiados y los principales carotenoides de los fototrofos anoxigénicos se muestran en la Figura 17.9. Estos pigmentos son los responsables de los colores brillantes rojo, rosa, verde, amarillo o marrón que se observan en diferentes especies de fototrofos anoxigénicos (*véanse* Figuras 12.2 y 12.5).

Los carotenoides se asocian estrechamente con la clorofila en la membrana fotosintética, pero no participan directamente en las reacciones de fotofosforilación. Sin embargo, pueden transferir energía a los centros de reacción para ser usada en la fotofosforilación, del mismo modo que la energía luminosa capturada directamente por la clorofila. Los carotenoides actúan también como agentes fotoprotectores. Con frecuencia, la luz brillante resulta perjudicial para las células porque causa reacciones fotooxidativas que producen oxígeno tóxico, como por ejemplo oxígeno singlete, $^1O_2$ (*véase* Sección 6.13), y pueden destruir el propio aparato fotosintético. Los carotenoides atenúan esas especies de oxígeno tóxico y absorben buena parte de la luz perjudicial. La función fotoprotectora de los carotenoides constituye una ventaja evidente, puesto que los organismos fototrofos tienen que vivir en presencia de luz.

Ficobilinas y ficobilisomas

Los cloroplastos de cianobacterias y algas rojas contienen **ficobiliproteínas**, que son los principales pigmentos captadores de luz en estos organismos. Las ficobiliproteínas son de color rojo o azul y son cadenas tetrapirrólicas abiertas acopladas a proteínas (Figura 17.10*a*). El pigmento rojo *ficoeritrina* presenta absorción máxima de luz a longitudes de onda próximas a 550 nm, mientras que el pigmento azul *ficocianina* (Figura 17.10*a*) presenta absorción máxima a 620 nm (Figura 17.11). Un tercer pigmento, llamado *aloficocianina*, absorbe a 650 nm.

Las ficobiliproteínas se presentan como agregados de alto peso molecular, llamados **ficobilisomas**, unidos a las membranas fotosintéticas (Figura 17.10*b*). Los ficobilisomas están construidos de modo que las moléculas de aloficocianina establecen contacto físico con la membrana fotosintética y están rodeados por moléculas de ficocianina y ficoeritrina. Estos últimos pigmentos absorben luz de longitud de onda más corta (de mayor energía) y transfieren la energía a la aloficocianina, que está estrechamente ligada a la clorofila del centro de reacción. Los ficobilisomas permiten, por tanto, un transporte eficiente de la energía desde los complejos de biliproteínas a la clorofila *a*, permitiendo el crecimiento de las cianobacterias incluso a bajas intensidades luminosas. De hecho, el contenido celular de ficobilisomas *aumenta* cuando la intensidad luminosa *disminuye*, de modo que las células que crecen a intensidades más bajas son las que más ficobilisomas contienen.

La función concentradora de luz de los pigmentos accesorios, como los carotenoides y las ficobilinas, constituye una ventaja para el organismo. La luz solar se distribuye por todo el rango del espectro visible, pero las clorofilas sólo absorben bien en una parte de este espectro. Con los pigmentos accesorios el organismo es capaz de capturar más luz (Figuras 17.3 y 17.11).

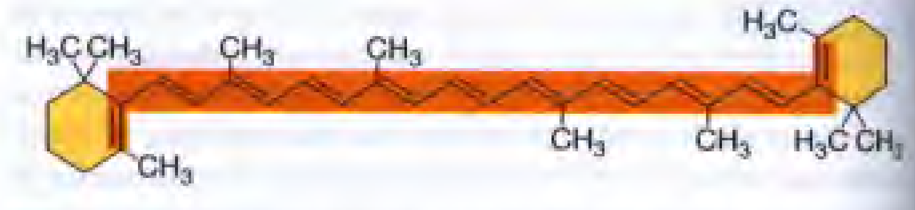


Figura 17.8 Estructura del β-caroteno, un carotenoide típico. Se destaca en color naranja el sistema de dobles enlaces conjugados.

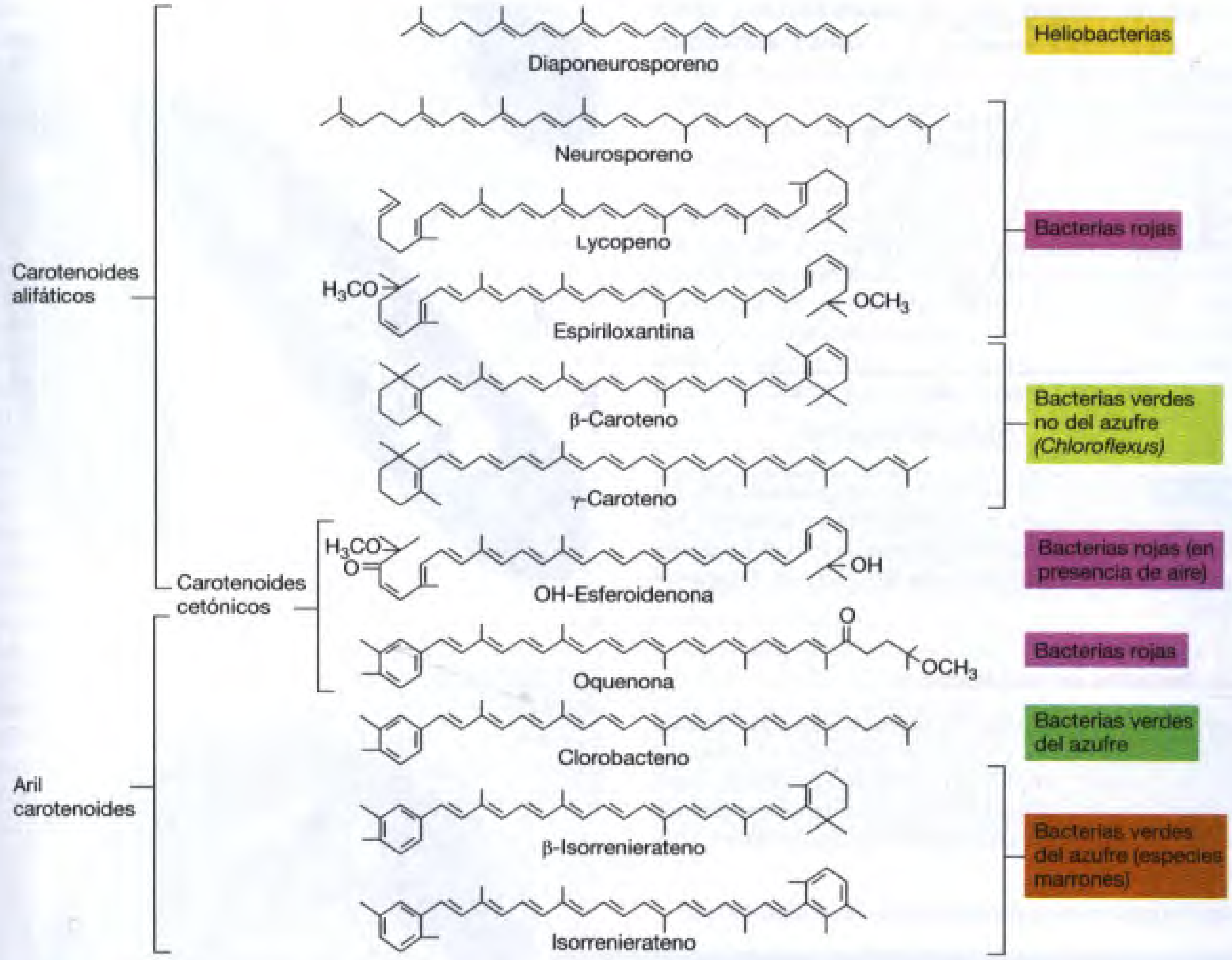
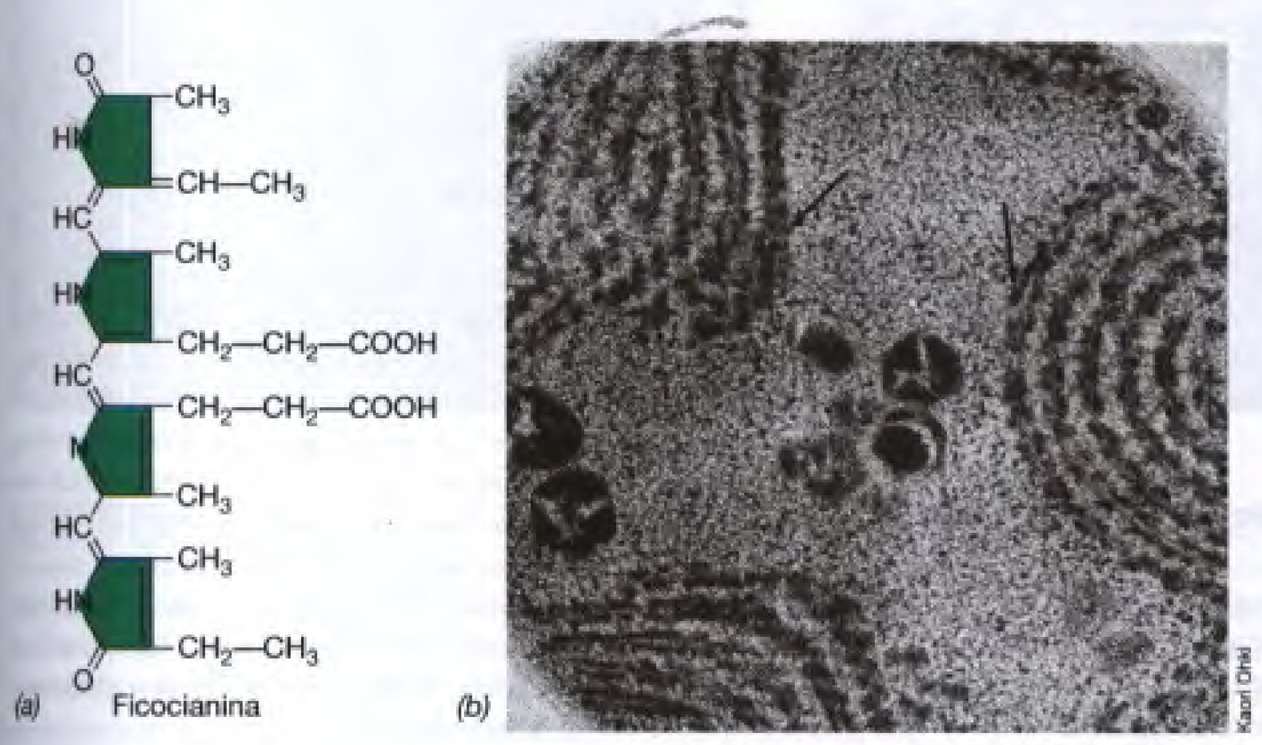

Diaponeurosporeno
Heliobacterias
Neurosporeno
Lycopeno
Bacterias rojas
Carotenoides alifáticos
H_3CO
OCH_3
Espiriloxantina
β-Caroteno
Bacterias verdes no del azufre (*Chloroflexus*)
γ-Caroteno
H_3CO
O
OH
Carotenoides cetónicos
OH-Esferoidenona
Bacterias rojas (en presencia de aire)
O
OCH_3
Oquenona
Bacterias rojas
Clorobacteno
Bacterias verdes del azufre
Aril carotenoides
β-Isorrenierateno
Bacterias verdes del azufre (especies marrones)
Isorrenierateno

Figura 17.9 Estructura de algunos carotenoides comunes de los fototrofos anoxigénicos. Compárese la estructura del β-caroteno que aparece en la Figura 17.8 con la que está aquí. Para simplificar, en las estructuras dibujadas aquí, los grupos metilo (CH_3) se designan sólo por sus enlaces. Los aril carotenoides se distinguen de los alifáticos en que los primeros contienen un anillo aromático en un extremo. En la Sección 12.2, se discute acerca de las bacterias rojas; en la 12.20, las heliobacterias; en la 12.32, las bacterias verdes del azufre y en la Sección 12.35, las bacterias verdes no del azufre.


O
CH_3
HN
$=CH—CH_3$
HC
CH_3
HN
$CH_2—CH_2—COOH$
HC
$CH_2—CH_2—COOH$
N
CH_3
HC
CH_3
HN
$CH_2—CH_3$
O
(a)
Ficocianina
(b)

Kaori Ohki

Figura 17.10 Ficobilinas y ficobilisomas. (a) Una ficobilina típica. Este compuesto es una cadena tetrapirrólica abierta que deriva biosintéticamente de un anillo porfirínico cerrado por pérdida de un átomo de carbono como monóxido de carbono. La estructura que se muestra es el grupo prostético de la ficocianina, un pigmento proteico que se encuentra en cianobacterias (*véase* Sección 12.25) y algas rojas (*véase* Sección 14.11). (b) Micrografía electrónica de una sección fina de la cianobacteria *Synechocystis*. Nótese la presencia de ficobilisomas esféricos (flechas) teñidos densamente y unidos a las membranas lamelares.

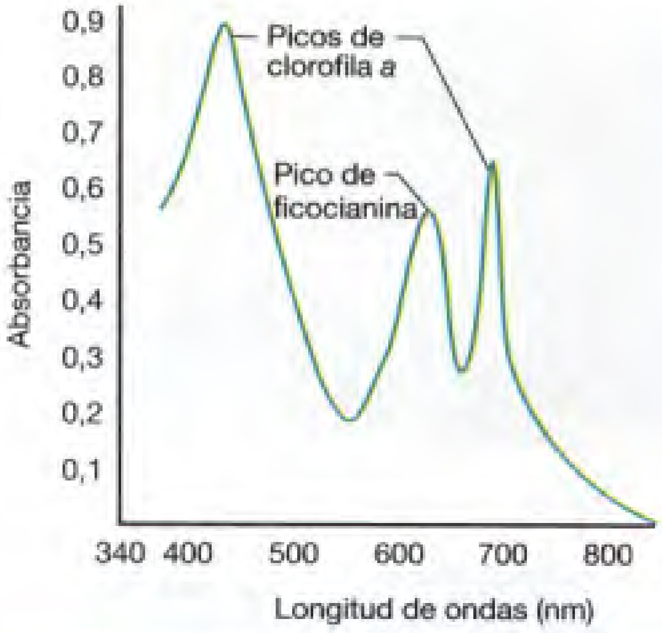


Figura 17.11 Espectro de absorción de una cianobacteria que tiene como pigmento accesorio una ficobiliproteína (ficocianina). Nótese cómo la presencia de ficocianina ensancha la zona de longitudes de onda de energía lumínica utilizable (entre 600 y 700 nm). Compárese con la Figura 17.3.

✓ 17.3 Revisión de conceptos

Los pigmentos accesorios, como los carotenoides y las ficobilinas, pueden absorber la luz y transferir la energía a la clorofila del centro de reacción, ampliando así las longitudes de onda que se pueden usar en la fotosíntesis. Los carotenoides también desempeñan un papel protector esencial evitando daños fotooxidativos en la célula.

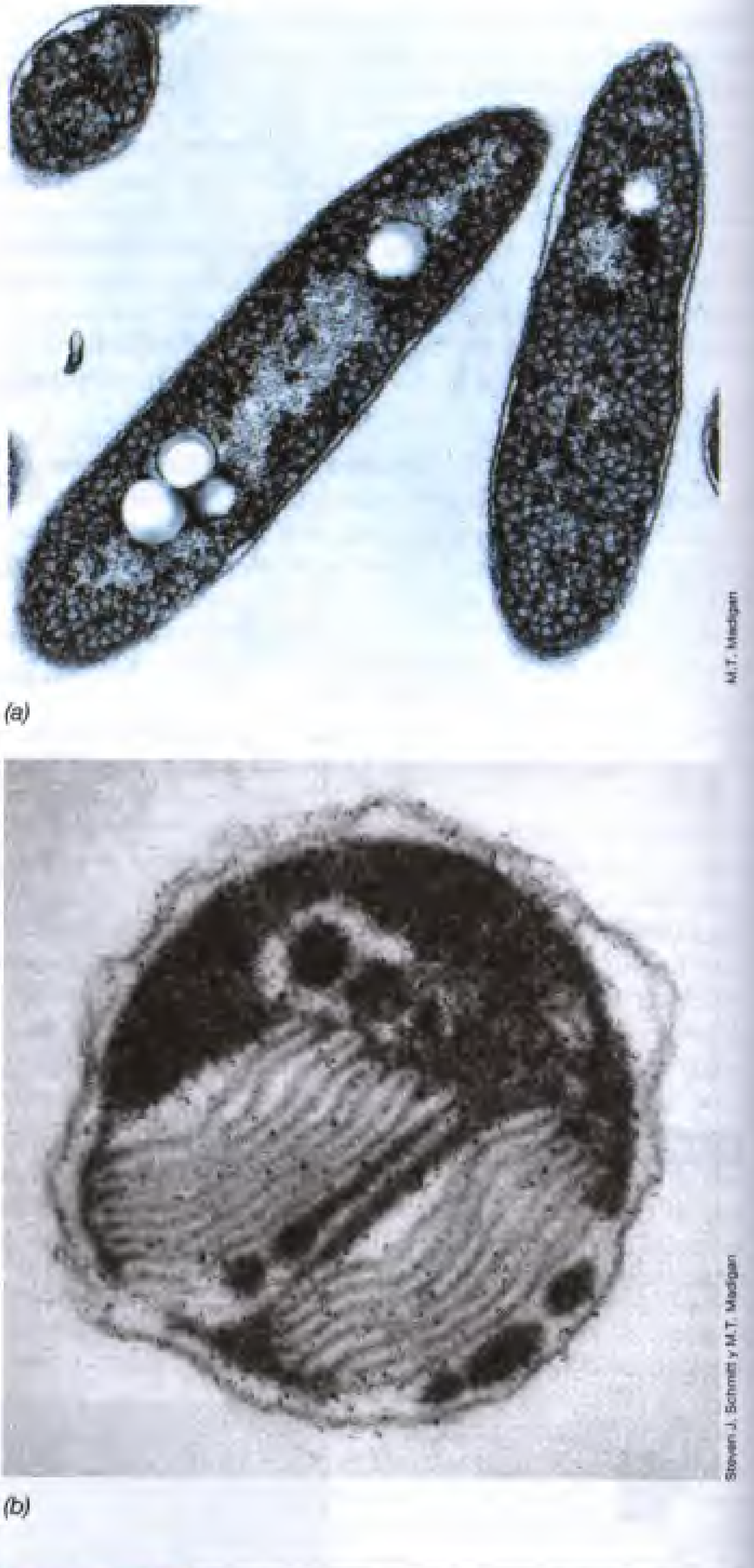
- ✓ ¿En qué organismos se encuentran las ficobiliproteínas?
- ✓ Compárese la estructura de una ficobilina con la de una clorofila.
- ✓ La ficocianina es de color verde azulado, ¿qué longitud de onda absorbe? (*Véase* Figura 10.6.)

17.4 Fotosíntesis anoxigénica

En todos los organismos fototrofos, el proceso de síntesis de ATP mediante la luz comprende un transporte de electrones a través de una secuencia de transportadores de electrones. Estos transportadores se disponen en la membrana fotosintética formando series que van desde aquellos que muestran un potencial de reducción electronegativo a los que tienen un potencial más electropositivo. A continuación, vamos a considerar la estructura del aparato fotosintético y los detalles del flujo fotosintético de electrones en las bacterias rojas, en las cuales se conocen bien los aspectos moleculares de la fotosíntesis.

Estructura del aparato fotosintético de las bacterias rojas

El aparato fotosintético de las bacterias rojas se localiza en sistemas membranosos intracitoplasmáticos de morfología variada. Un tipo observado comúnmente consiste en vesículas membranosas (cromatóforos) o lamelas (Figura 17.12).



M.T. Madigan

Steven J. Schmitt y M.T. Madigan

Figura 17.12 Membranas de fototrofos anoxigénicos. (a) Cromatóforos. Sección transversal de una célula de la bacteria roja fototrófica *Rhodobacter capsulatus* que contiene abundantes membranas fotosintéticas vesiculares. Las vesículas son invaginaciones de la membrana citoplasmática. Las áreas claras corresponden a regiones de la célula donde se almacena el polímero de reserva, poli-β-hidroxibutirato (*véase* Sección 4.13). La célula tiene aproximadamente 1 µm de anchura. (b) Membranas lamelares de una bacteria halófila roja. La anchura de la célula es aproximadamente de 1,5 µm. Estas membranas también proceden de la invaginación de la membrana citoplasmática, pero, en lugar de formar vesículas, se apilan de la misma manera que los tilacoides de las cianobacterias (Figura 17.5).

El aparato fotosintético consta de cuatro complejos pigmento-proteína unidos a membrana, más un complejo de ATPasa que permite la síntesis de ATP a expensas de una fuerza protón motriz (*véase* Sección 5.12). Tres de los cuatro complejos, el *centro de reacción*, el *componente captador de luz I* y el *componente captador de luz II*, son específicos de la fotosíntesis; el cuarto complejo del aparato fotosintético, el *complejo del citocromo* bc_1, es común tanto a la respiración como a la fotosíntesis. La estructura y función del complejo del citocromo bc_1 se comentó en la Sección 5.11.

Mediante difracción de rayos X, se ha cristalizado el centro de reacción fotosintético de las bacterias rojas y se ha determinado su estructura hasta una resolución de nivel atómico (Figura 17.13*a*). Los centros de reacción de las bacterias rojas contienen tres polipéptidos designados como subunidades L, M y H. Estas proteínas están firmemente embebidas en la membrana fotosintética y la atraviesan varias veces (Figura 17.13*b*). Los polipéptidos L, M y H unen el complejo del centro fotoquímico de reacción, que consta de dos moléculas de bacteroclorofila *a*, denominadas el *par especial*, dos moléculas adicionales de bacterioclorofila *a*, cuya función es desconocida, dos moléculas de *bacteriofeofitina* (bacterioclorofila *a* menos su átomo de magnesio), dos moléculas de quinona y dos moléculas de un carotenoide. Todos los componentes del centro de reacción se integran de tal modo que pueden interaccionar en reacciones rápidas de transferencia de electrones que, como veremos, conducen finalmente a la producción de ATP.

Flujo fotosintético de electrones en las bacterias rojas

Recordemos que el centro de reacción fotosintético está rodeado por moléculas antena de bacterioclorofila *a* captadoras de luz, que funcionan canalizando la energía luminosa hacia el centro de reacción (*véase* Figura 17.6). La energía de la luz se transfiere desde la antena al centro de reacción en paquetes llamados *excitones*, estados electrónicos móviles que se desplazan con alta eficacia desde la antena al centro de reacción. La fotosíntesis comienza cuando la energía de un excitón alcanza las moléculas del par especial de bacterioclorofila *a* (Figura 17.13*a*). La absorción de la energía excita el par especial convirtiéndolo en un fuerte donador de electrones, con un potencial de reducción muy bajo (E_0') (*véase* Sección 5.4). Tras la producción de este fuerte donador de electrones, se llevan a cabo los pasos siguientes en el flujo fotosintético de electrones para conservar la energía liberada cuando los electrones son transportados a través de la membrana desde los portadores de bajo E_0' a los de elevado E_0' (Figura 17.14).

Antes de la excitación, el centro de reacción denominado *P870* tiene un E_0' de cerca de +0,5 V; tras la excitación, el potencial se aproxima a −1,0 V (Figura 17.14). El electrón excitado dentro de P870 pasa a reducir una molécula de bacteriofeofitina del centro de reacción (Figuras 17.13*b* y 17.14). Esta transición es extraordinariamente rápida, con una duración de tres billonésimas de segundo (3×10^{-12} s). Una vez reducida, la bacteriofeofitina *a* reduce primero varias quinonas intermediarias y finalmente una

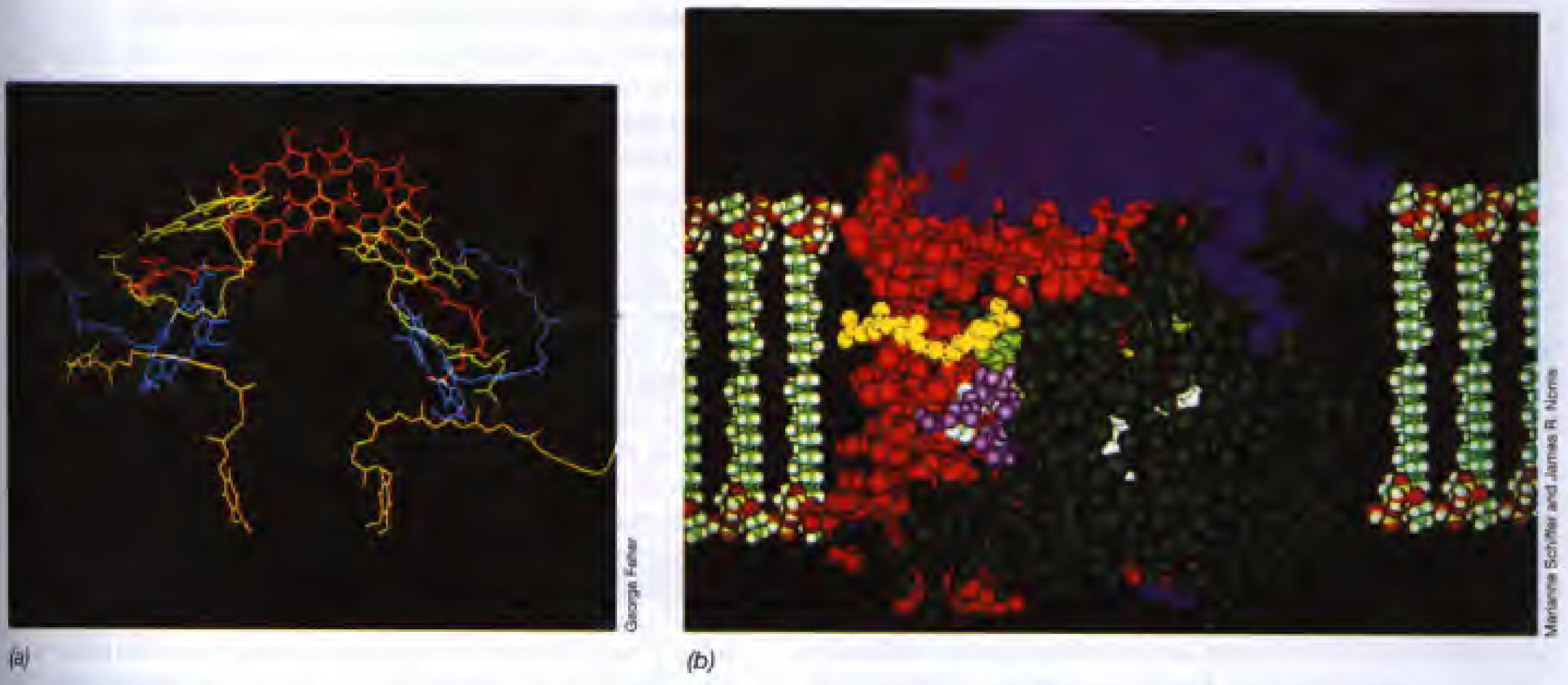


Figura 17.13 Estructura del centro de reacción de las bacterias fototrofas rojas. (a) Disposición de los componentes en el centro de reacción. El «par especial» de moléculas de bacterioclorofila se superponen y se muestran en rojo, y las moléculas de quinona aparecen en amarillo oscuro y boca abajo. Las bacterioclorofilas accesorias se indican en amarillo claro junto al par especial, y las moléculas de bacteriofeofitina se muestran en tonos azulados. (b) Modelo molecular de la estructura proteica del centro de reacción. Los pigmentos mencionados en (a) se unen a la membrana por tres proteínas del centro de reacción llamadas proteínas H (azul), M (roja) y L (verde). El complejo pigmento-proteína del centro de reacción está integrado en la bicapa lipídica.

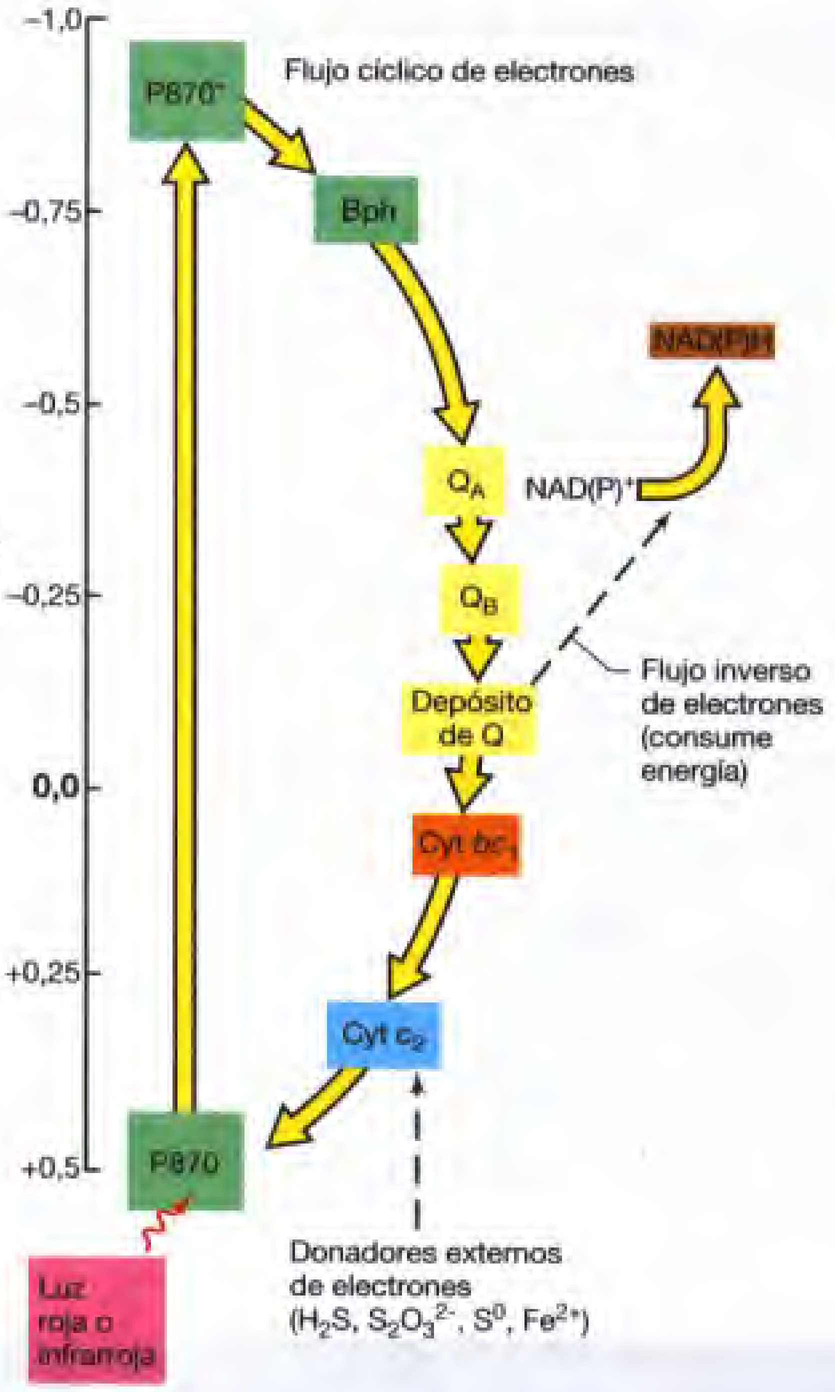

−1,0
−0,75
−0,5
$E_0{}'$ (V) −0,25
0,0
+0,25
+0,5
P870*
Flujo cíclico de electrones
Bph
NAD(P)H
Q_A
NAD(P)$^+$
Q_B
Depósito de Q
Flujo inverso de electrones (consume energía)
Cyt bc_1
Cyt c_2
P870
Luz roja o infrarroja
Donadores externos de electrones (H_2S, $S_2O_3{}^{2-}$, S^0, Fe^{2+})

Figura 17.14 Esquema general del flujo de electrones en la fotosíntesis anoxigénica de una bacteria roja. Sólo se indica una reacción luminosa. Nótese cómo la energía lumínica convierte un donador de electrones débil, P870, en uno muy fuerte, P870*, y que a continuación los pasos restantes del flujo de electrones fotosintético son en su mayoría los mismos que en el flujo de electrones respiratorio. RC, centro de reacción; Bchl, bacterioclorofila; Bph, bacteriofeofitina; Q_A, Q_B, quinonas intermediarias; depósito de Q, conjunto de quinonas de la membrana y Cyt, citocromo.

quinona del «depósito de quinonas» (*quinone pool*), que se encuentran en la membrana. Esta transición es también muy rápida, dura menos de una mil millonésima de segundo (Figuras 17.14 y 17.15). En comparación con las que ocurren en el centro de reacción, las reacciones posteriores de transporte de electrones son más bien lentas, del orden de micro- o milisegundos. Desde la quinona, los electrones se transportan en la membrana a través de una serie de ferro-sulfoproteínas y citocromos (Figuras 17.14 y 17.15), volviendo finalmente al centro de reacción. Las proteínas clave en este transporte son el citocromo bc_1 y el citocromo c_2 (Figura 17.14). El citocromo c_2 es periplasmático y sirve como transportador de electrones entre el complejo bc_1, unido a membrana, y el centro de reacción (*véanse* Sección 5.11 y Figuras 5.20, 17.14 y 17.15).

Fotofosforilación

La síntesis de ATP durante el flujo fotosintético de electrones es el resultado de la formación de un gradiente electroquímico de protones o *fuerza protón motriz*, generada por la salida de protones durante el transporte de electrones, y la actividad de ATPasas que acoplan la desaparición del gradiente de protones a la formación de ATP (*véase* Sección 5.12). La serie de reacciones se completa cuando el citocromo c_2 dona un electrón al par especial de bacterioclorofilas (Figura 17.14), volviendo estas moléculas a su estado original de potencial ($E_0{}' = +0{,}5$ V). Entonces, el centro de reacción es capaz de absorber nueva energía repitiendo el proceso. Este método de producir ATP se llama **fotofosforilación cíclica**, porque los electrones se mueven repetidamente en círculo. La fotofosforilación cíclica se parece a la respiración en la que el flujo de electrones a través de la membrana establece una fuerza protón motriz. Sin embargo, a diferencia de la respiración, en la fotofosforilación cíclica no hay *entrada neta ni consumo de electrones;* los electrones viajan simplemente por una vía cerrada.

En la Figura 17.15, se ilustran las relaciones espaciales de los componentes del transporte de electrones en la membrana fotosintética bacteriana. Como en el flujo respiratorio de electrones (*véase* Sección 5.11), el complejo del citocromo bc_1 interacciona con el depósito de quinonas durante el flujo fotosintético de electrones (*véase* Figura 5.20) como medio fundamental para establecer la fuerza protón motriz que alimenta la síntesis de ATP (Figura 17.15).

Genética de la fotosíntesis bacteriana

Las bacterias fotosintéticas rojas son procariotas Gram negativos (*véase* Sección 12.2), y algunas especies son muy adecuadas para la manipulación genética. Especies del género *Rhodobacter*, especialmente *R. capsulatus* y *R. sphaeroides*, han sido los principales sistemas de investigación genética en fotosíntesis bacteriana. En *R. capsulatus*, la mayor parte de los genes que intervienen en la fotosíntesis están agrupados en varios operones que ocupan en el cromosoma una región de 50 kb llamada **agrupación** (*cluster*) **génica fotosintética** (Figura 17.16). Estos genes codifican proteínas implicadas en (1) la biosíntesis de bacterioclorofilas (genes *bch*) y (2) la de carotenoides (genes *crt*), así como (3) la de polipéptidos que unen moléculas de pigmentos de los centros de reacción con los complejos captadores de luz (genes *puf* y *puh*) (Figura 17.16).

Como es de suponer, en las bacterias fototrofas la síntesis de las proteínas que se unen a la bacterioclorofila, carotenoides y pigmentos tiene que ser un proceso muy coordinado. Cuando se sintetizan nuevos complejos fotosintéticos deben encontrarse dentro de la célula las proporciones correctas de cada uno de los componentes para el ensamblaje final. El análisis bioquímico y genético de la fotosíntesis en *Rhodobacter capsulatus* ha demostrado la existencia de esta expresión coordinada de los componentes fotosintéticos debido a que los operones se disponen formando **superoperones**. Los transcritos de los operones relacionados

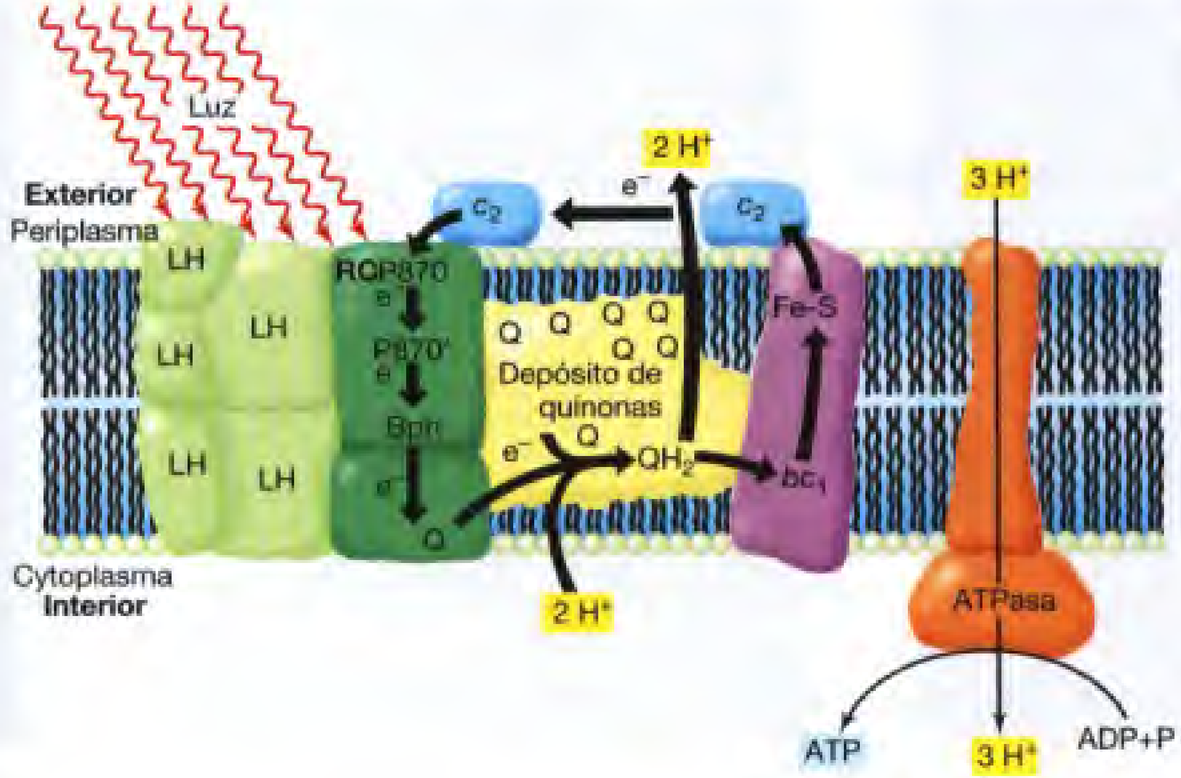


Figura 17.15 Disposición de los complejos proteicos en la membrana fotosintética de una bacteria fototrofa roja. El gradiente de protones generado por la luz se utiliza para la síntesis de ATP por la ATP sintasa (ATPasa). LH, complejos de bacterioclorofila captadores de luz; RC, centro de reacción; Bchl, bacterioclorofila; Bph, bacteriofeofitina; Q, quinona; FeS, proteína con hierro y azufre; *bc*1, complejo de citocromo *bc*1; *c*2, citocromo *c*2. Para una descripción del funcionamiento del complejo *bc*1 y del ciclo Q, cuyos detalles no aparecen aquí, *véase* Figura 5.20.

con la biosíntesis de pigmentos (*bch* y *crt*) (Figura 17.16), en vez de terminar al final de un operón, se alargan por los promotores y genes estructurales que codifican los polipéptidos de los complejos fotosintéticos, constituyendo largos transcritos que codifican más de una proteína. Los superoperones de la fotosíntesis permiten así la transcripción de muchos genes relacionados funcionalmente, cuyos productos interaccionan y forman los complejos fotosintéticos que posteriormente se incorporan a la membrana. La señal reguladora que controla la transcripción del agrupamiento génico fotosintético en estos organismos es el O_2. El oxígeno molecular reprime la síntesis de pigmentos, de tal modo que la fotosíntesis en los fototrofos anoxigénicos sólo se produce bajo condiciones *anóxicas*.

Para el análisis genético de la fotosíntesis de las bacterias rojas ha sido de gran ayuda la diversidad bioenergética de las especies de *Rhodobacter*; además de su capacidad para la fotosíntesis, estos microorganismos pueden crecer en la oscuridad por respiración en presencia o ausencia de oxígeno. De esta forma, se pueden obtener fácilmente mutantes incapaces de fotosintetizar que se han utilizado en experimentos de intercambio genético (*véase* Capítulo 10) para caracterizar el número, organización y expresión de genes fotosintéticos.

Autotrofia en bacterias rojas: donadores de electrones y transporte inverso de electrones

La formación de ATP no es suficiente para el crecimiento autotrófico de una bacteria roja; es necesaria la formación de poder reductor (NADH o NADPH), de manera que el CO_2 se pueda reducir hasta el nivel del material celular. Como se ha mencionado anteriormente, en las bacterias rojas del azufre esto se hace habitualmente con H_2S, aunque también se puede emplear S^0, $S_2O_3^{2-}$ e incluso Fe^{2+} en diferentes especies. Cuando el donador de electrones es H_2S, se almacenan glóbulos de S^0 en el interior de las células (Figura 17.17*a*). ¿Cómo reducen estas sustancias el NAD^+ a NADH?

Las sustancias reducidas como el **sulfuro de hidrógeno** (H_2S) o el **tiosulfato** ($S_2O_3^{2-}$) son oxidadas por citocromos del tipo *c* y sus electrones acaban en el «depósito de quinonas» de la membrana fotosintética (*véase* Figura 17.14). Sin embargo, el E_0' de la quinona (alrededor de 0 voltios) no es lo suficientemente negativo para reducir NAD^+ (−0,32 voltios) directamente, de manera que en esas condiciones los electrones del depósito de quinonas son forzados a *retroceder*, contra el gradiente termodinámico, para reducir el NAD^+ a NADH (Figura 17.14). Este proceso que consume energía recibe el nombre de *transporte inverso de electrones* y

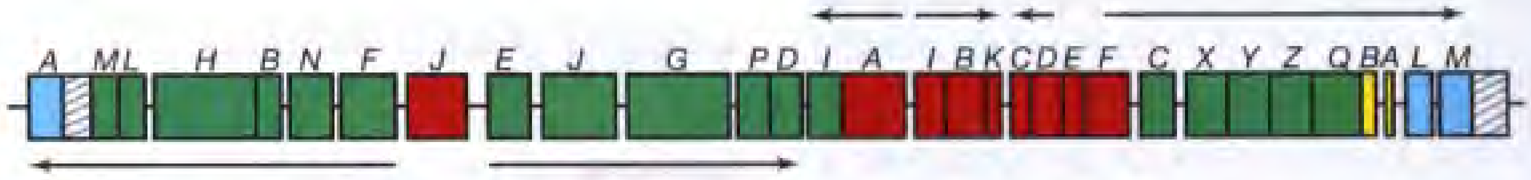
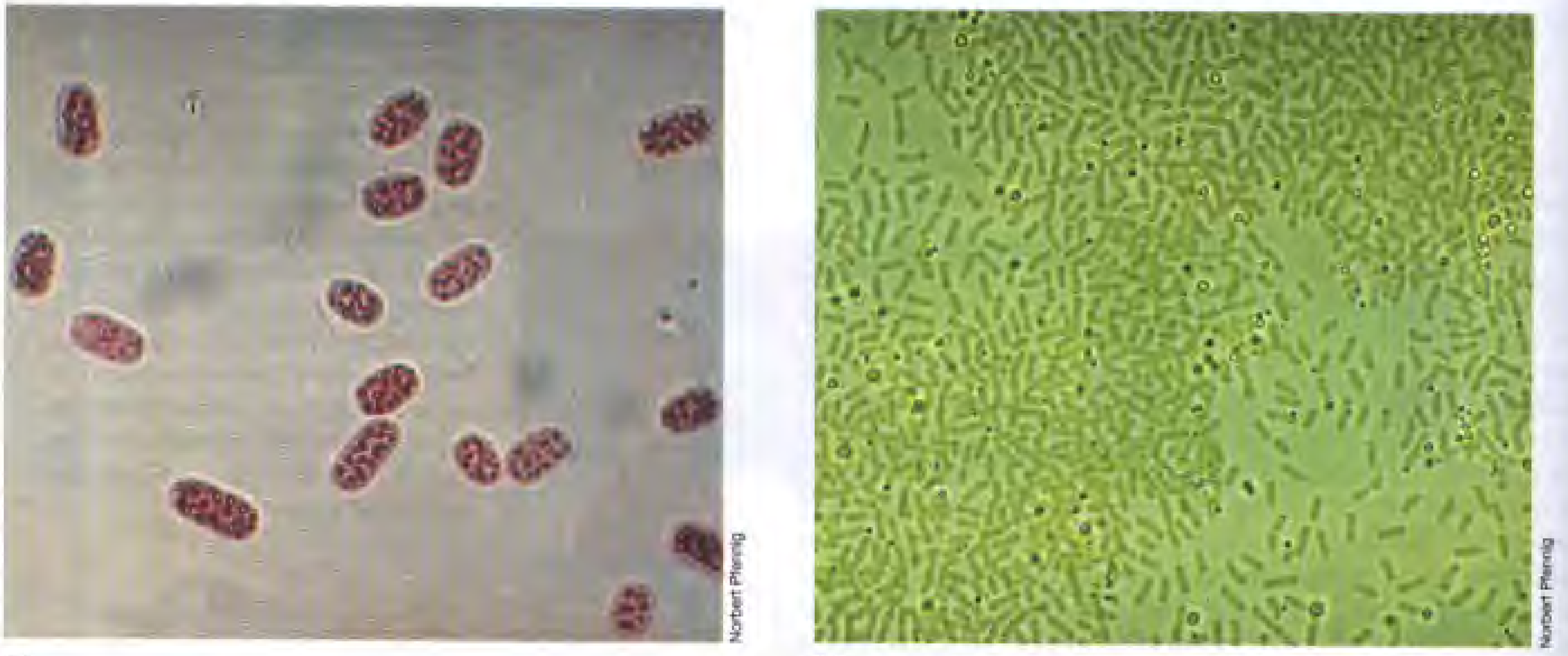

A ML H B N F J E J G P D I A I B K C D E F C X Y Z Q B A L M

Figura 17.16 Mapa de la agrupación de genes fotosintéticos de la bacteria fototrofa roja *Rhodobacter capsulatus*. Los genes se disponen en superoperones, donde los transcritos de los operones de la biosíntesis de pigmentos se prolongan incluyendo la transcripción de los polipéptidos de los complejos fotosintéticos. Los genes *bch*, que codifican las proteínas que sintetizan bacterioclorofila, se muestran en verde, mientras que los genes *crt*, que codifican las proteínas que sintetizan carotenoides, se muestran en rojo. Los genes que codifican los polipéptidos del centro de reacción (genes *puh* y *puf*) se indican en azul, y los genes que codifican los polipéptidos del sistema captador de luz I (complejo B870) (genes *puf*) se indican en amarillo. Los genes cuya función se desconoce se han representado con líneas diagonales. No todos los genes se han designado con letras. Las flechas indican la dirección de la transcripción.



(a) (b)

Figura 17.17 Micrografías de bacterias fototróficas por microscopia de campo claro. (a) Una bacteria roja: *Chromatium okenii*. Se observan los gránulos de azufre depositados en el interior de la célula. (b) Una bacteria verde: *Chlorobium limicola*. Los cuerpos refráctiles son gránulos de azufre depositados fuera de la célula. En ambos casos, los gránulos de azufre provienen de la oxidación de H_2S para obtener poder reductor.

está impulsado por la energía de la fuerza protón motriz. El transporte inverso de electrones es también el mecanismo por el cual los quimiolitotrofos obtienen su poder reductor, a menudo de donadores de electrones E_0' extremadamente positivos (*véanse* Secciones 17.8-17.12).

Comparación del transporte fotosintético de electrones y la síntesis de poder reductor en otros fototrofos anoxigénicos

Hasta aquí hemos centrado la discusión del transporte fotosintético de electrones en las bacterias rojas. Aunque componentes similares de membranas impulsan la fotofosforilación en otros microorganismos fototrofos anoxigénicos, existen diferencias en algunas de las reacciones fotoquímicas que influyen en la biosíntesis de poder reductor. La Figura 17.18 compara las reacciones luminosas de las bacterias rojas, las verdes y las heliobacterias. Adviértase que, en los dos últimos grupos, el estado de excitación de las bacterioclorofilas del centro de reacción reside en un E_0' mucho más negativo, y que la propia *clorofila a* (en las bacterias verdes), o una forma estructuralmente modificada de *clorofila a* llamada *hidroxiclorofila a* (en las heliobacterias), está presente en el centro de reacción. Esto significa que a diferencia de las bacterias rojas, donde la primera molécula aceptora estable (la quinona) tiene un E_0' de unos 0 voltios, el E_0' de los aceptores de las bacterias verdes y de las heliobacterias (proteínas FeS) es mucho más electronegativo que el NADH. En las bacterias verdes, la ferredoxina (reducida por la proteína FeS, Figura 17.18) sirve directamente como donador de electrones para las reacciones de fijación de CO_2 en el ciclo inverso del ácido cítrico (*véase* Figura 17.24*a*). De esta forma, al igual que los fototrofos oxigénicos (que se tratan a continuación), en las bacterias verdes y en las heliobacterias tanto el ATP como el poder reductor son productos directos de las reacciones luminosas. Cuando el donador de electrones para la síntesis de poder reductor en las bacterias verdes es el sulfuro, se producen glóbulos de S^0 igual que en el caso de las bacterias rojas, pero los glóbulos permanecen en el *exterior* de la célula, en vez de en el *interior* (Figura 17.17*b*).

✓ 17.4 Revisión de conceptos

En el centro de reacción fotosintético de los organismos fototrofos anoxigénicos tiene lugar una serie de reacciones de transporte de electrones cuyo resultado es la formación de una fuerza protón motriz y la síntesis de ATP. El poder reductor para la fijación de CO_2 deriva de reductores presentes en el medio y en las bacterias rojas precisa del transporte inverso de electrones.

✓ Compárese la fotofosforilación con la fosforilación que tiene lugar por transporte de electrones en la respiración.

✓ ¿Por qué es importante la ordenación de los genes de la fotosíntesis en *superoperones*?

✓ ¿En qué consiste el *transporte inverso de electrones* y por qué es necesario?

17.5 Fotosíntesis oxigénica

Al contrario que en los organismos fototrofos anoxigénicos, en el flujo de electrones de los fototrofos oxigénicos intervienen dos reacciones fotoquímicas distintas pero interconectadas. Los fototrofos oxigénicos emplean la luz para producir *tanto* ATP *como* NADPH, y los electrones para este último proceden de la separación del *agua* en oxígeno

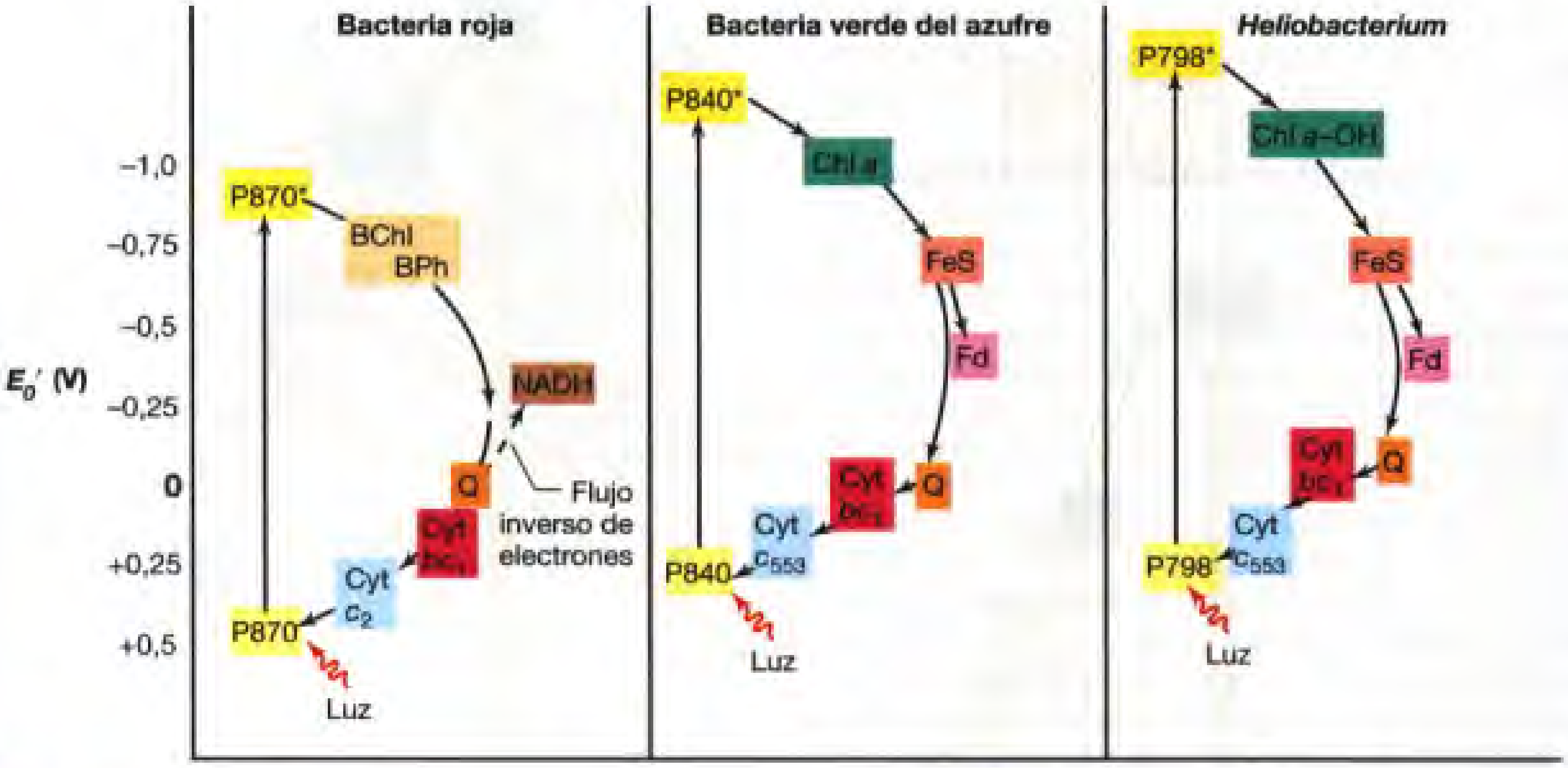


Figura 17.18 Comparación del flujo de electrones en las bacterias rojas, bacterias verdes del azufre y heliobacterias. La necesidad del flujo inverso de electrones en las bacterias rojas se pone de manifiesto por el hecho de que el aceptor primario (quinona, Q) tiene un potencial más positivo que el par NAD^+/NADH. En las bacterias verdes y heliobacterias, la ferrodoxina (Fd), cuyo E_0' es más negativo que el de NADH, la producción de ferredoxina tiene lugar por reacciones impulsadas por la luz. Una ferredoxina de bacteria verde impulsa las reacciones de carboxilación autotrófica (*véase* Figura 17.24*a*). Bchl, bacterioclorofila; BPh, bacteriofeofitina. P870 y P840 son centros de reacción de las bacterias rojas y verdes, respectivamente, y están compuestas por Bchl *a*. El centro de reacción de las heliobacterias (P798) contiene Bchl *g*. El centro de reacción de *Chloroflexus* es similar al de las bacterias rojas. Obsérvese la presencia de formas de clorofila *a* en los centros de reacción de las bacterias verdes y heliobacterias.

y electrones (Figura 17.2). Los dos sistemas de reacciones luminosas se llaman *fotosistema I* y *fotosistema II*, y cada uno de ellos tiene una forma de clorofila *a* en el centro de reacción espectralmente diferente. La clorofila del fotosistema I, llamada P700, absorbe luz de longitudes de onda largas (infrarrojo), mientras que la clorofila del fotosistema II, llamada P680, absorbe a longitudes de onda más cortas (rojo). Como en el caso de la fotosíntesis anoxigénica, las reacciones fotoquímicas oxigénicas se producen en membranas. En las células eucariotas, estas membranas se encuentran en los *cloroplastos* (Figura 17.5), mientras que en las cianobacterias las membranas fotosintéticas se apilan en el citoplasma (Figura 17.6). En ambos grupos de fototrofos, las membranas se disponen de modo similar y las dos formas de clorofila *a* se unen a proteínas específicas en la membrana e interaccionan tal como se indica en la Figura 17.19.

Flujo de electrones en la fotosíntesis oxigénica

La trayectoria del flujo electrónico en los fototrofos oxigénicos recuerda a una letra Z tumbada. Tanto es así que los científicos que estudian la fotosíntesis oxigénica se refieren a este flujo como el esquema «Z». El potencial de reducción de la molécula de clorofila *a* de P680 en el fotosistema II es muy electropositivo, un poco más positivo que el del par O_2/H_2O. Esto facilita el primer paso en el transporte de electrones, la *fotolisis* del agua en átomos de oxígeno e hidrógeno (Figura 17.19), una reacción que es desfavorable termodinámicamente. Un electrón del agua pasa a la molécula oxidada de P680 tras la absorción de un cuanto de luz de 680 nm. La energía de la luz convierte P680 en un reductor relativamente fuerte, capaz de reducir una molécula intermediaria de E_0' próximo a −0,5 V. La naturaleza de esta molécula es dudosa, pero probablemente se trata de una feofitina *a* (clorofila *a* sin el átomo de magnesio). Desde aquí, el electrón viaja por una serie de transportadores en la membrana que incluye quinonas, citocromos y una proteína con cobre llamada *plastocianina;* esta última cede electrones al fotosistema II. El electrón es aceptado por la clorofila del centro de reacción del fotosistema I, P700, que previamente ha absorbido cuantos de luz e inicia los pasos que llevan a la reducción de $NADP^+$ (Figura 17.18). En el proceso, se produce transferencia de electrones a través de diversos portadores con valores de E_0' en aumento, finalizando con la reducción de $NADP^+$ (Figura 17.19).

Síntesis de ATP en la fotosíntesis oxigénica

Además de la síntesis neta de poder reductor (es decir, NADPH), se producen otros hechos importantes mientras los electrones fluyen en la membrana de un fotosistema a otro. Durante la transferencia de un electrón desde el aceptor en el fotosistema II a la molécula de clorofila del centro de reacción en el fotosistema I, se produce transporte de electrones en una dirección termodinámicamente favorable (de negativo a positivo). Esto genera una fuerza protón motriz que produce ATP. Este tipo de generación de ATP se llama fotofosforilación *no cíclica* porque los electrones cuyo transporte origina la formación de ATP no vuelven a reducir el P680 oxidado. En realidad son usados para la reduc-

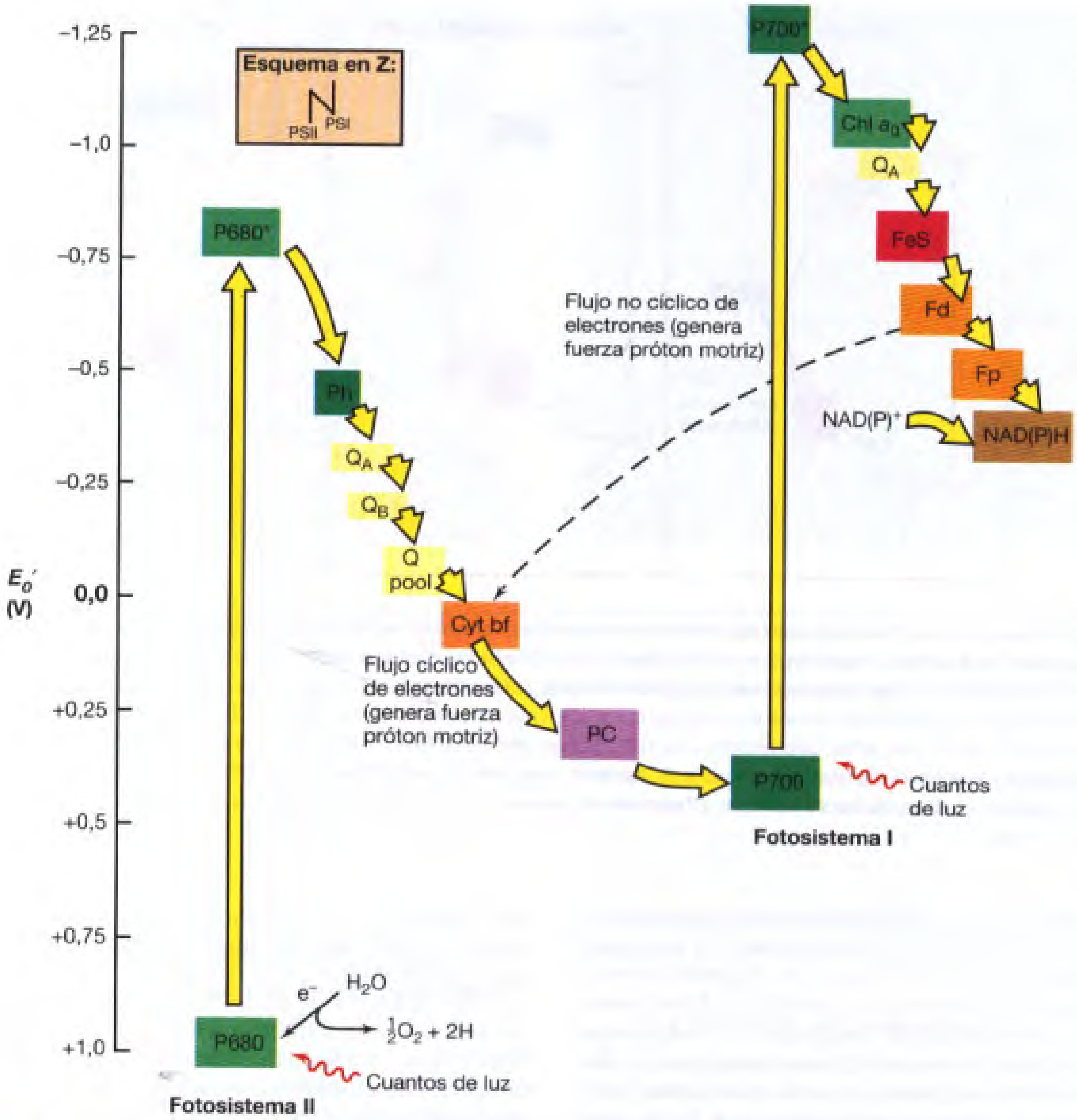

Esquema en Z:
PSII
PSI
−1,25
−1,0
−0,75
−0,5
−0,25
E_0' (V)
0,0
+0,25
+0,5
+0,75
+1,0
P680*
Ph
Q_A
Q_B
Q pool
Cyt bf
Flujo cíclico de electrones (genera fuerza prótón motriz)
PC
P700
Cuantos de luz
Fotosistema I
P700*
Chl a_0
Q_A
FeS
Fd
Fp
NAD(P)⁺
NAD(P)H
Flujo no cíclico de electrones (genera fuerza prótón motriz)
P680
e^-
H_2O
$\frac{1}{2}O_2 + 2H$
Cuantos de luz
Fotosistema II

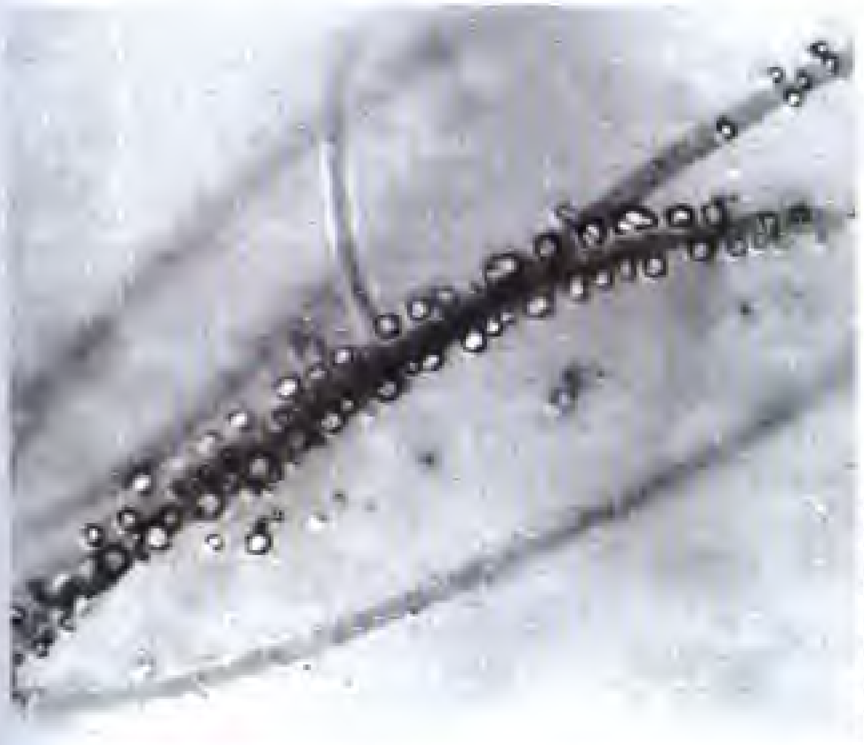
Figura 17.19 Flujo de electrones en la fotosíntesis oxigénica (plantas verdes) y el esquema en «Z». Intervienen dos fotosistemas (PS), PS I y PS II. Ph, feofitina; Q, quinona; Chl, clorofila *a*; Cyt, citocromo; PC, plastocianina; FeS, ferro-sulfoproteína sin grupo hemo; Fd, ferredoxina; Fp, flavoproteína; P680 y P700 son los centros de reacción para las clorofilas de PS II y PS I, respectivamente. Compárese con la Figura 17.14.

ción de NADP$^+$. Cuando existe suficiente poder reductor, también se puede producir ATP en los fototrofos oxigénicos por fotofosforilación *cíclica*, en la que funciona sólo el fotosistema I (Figura 17.18). Esto ocurre cuando los electrones se desplazan desde la ferredoxina al complejo del citocromo *bf*, desde donde el transporte de electrones devuelve el electrón a P700. Este flujo crea un potencial de membrana y hay síntesis adicional de ATP (*véase* la línea discontinua en la Figura 17.19).

Fotosíntesis anoxigénica en fototrofos oxigénicos

Los fotosistemas I y II funcionan normalmente juntos en el proceso oxigénico. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, muchas algas y algunas cianobacterias son capaces de efectuar fotofosforilación cíclica usando *sólo* el fotosistema I y obteniendo el poder reductor de fuentes distintas del agua. Esto es, de hecho, una fotosíntesis *anoxigénica*, como la que llevan a cabo las bacterias rojas y las verdes.

Algunas cianobacterias pueden usar H_2S como donador de electrones para la fotosíntesis anoxigénica, en tanto que las algas verdes pueden usar H_2. Cuando se usa H_2S, se oxida a azufre elemental (S^0) y se depositan fuera de la célula gránulos de azufre similares a los producidos por las bacterias verdes del azufre (*véase* Figura 17.17*b*); un ejemplo lo proporciona *Oscillatoria limnetica* en la Figura 17.20. Esta cianobacteria filamentosa vive en charcas salinas ricas en sulfuros, donde puede llevar a cabo fotosíntesis anoxigénica junto con las bacterias fotosintéticas rojas y verdes, dando azufre como producto de oxidación del sulfuro (Figura 17.20). En cultivos de *O. limnetica*, el flujo de electro-



Yehuda Cohen y Moshe Shilo

Figura 17.20 Célula de la cianobacteria filamentosa *Oscillatoria limnetica* creciendo anaeróbicamente en sulfuro como donador de electrones fotosintético. Se observan claramente los glóbulos de azufre elemental, producto de la oxidación del sulfuro, formados fuera de la célula.

nes por el fotosistema II resulta notablemente inhibido por la presencia de H_2S, por lo que el organismo necesita fotosíntesis anoxigénica para sobrevivir.

Desde un punto de vista evolutivo, la existencia de fotofosforilación cíclica tanto en los fototrofos oxigénicos como anoxigénicos indica una estrecha relación filogenética. Aunque organismos como *Oscillatoria limnetica*, que realizan fotosíntesis oxigénica, han adquirido el fotosistema II y en consecuencia la capacidad para romper el H_2O, bajo ciertas condiciones todavía conservan la capacidad de usar sólo el fotosistema I.

✓ *17.5 Revisión de conceptos*

En la fotosíntesis oxigénica, el agua da electrones y se produce oxígeno. Intervienen por separado dos reacciones luminosas, el fotosistema I y el II. El fotosistema I se parece al sistema característico de la fotosíntesis anoxigénica. El fotosistema II es responsable de romper H_2O produciendo O_2.

- ✓ ¿Por qué se emplea el término transporte de electrones *no cíclico* en relación con la fotosíntesis anoxigénica?
- ✓ ¿Cuál es la principal diferencia entre las moléculas de clorofila de los dos centros de reacción en los fotosistemas I y II?

17.6 Fijación autotrófica de CO$_2$: el ciclo de Calvin

Se conocen algunos de los diversos mecanismos bioquímicos de fijación de CO_2 para dar material celular. En esta sección se va a tratar el sistema más extendido, el **ciclo de Calvin**, que debe su nombre a su descubridor, Melvin Calvin. El ciclo requiere NAD(P)H y ATP y dos enzimas clave, la *ribulosa bisfosfato carboxilasa* y la *fosforribuloquinasa*. El resto del ciclo lo dirigen varias enzimas que están presentes en numerosos organismos, tanto autotrofos como heterotrofos.

RubisCO y formación de PGA

El primer paso en la reducción del CO_2 por el ciclo de Calvin es la reacción catalizada por la enzima ribulosa bisfosfato carboxilasa (*RubisCO*). Esta enzima es de amplia distribución y está presente en las bacterias rojas, cianobacterias, algas y plantas verdes, en la mayoría de quimiolitotrofos del dominio *Bacteria*, e incluso en algunas especies del dominio *Archaea*, como las formas estructuralmente únicas de arqueas hipertermófilas. La RubisCO cataliza la formación de dos moléculas de *ácido 3-fosfoglicérico* (PGA) a partir de ribulosa bisfosfato y de CO_2, como se muestra en la Figura 17.21. Después, el PGA es fosforilado y reducido al nivel del intermediario esencial de la glicólisis, el *gliceraldehído 3-fosfato* (*véase* Sección 5.10). A partir de aquí, se puede formar la glucosa por el camino inverso de los primeros pasos de la glicólisis. Pero, si sólo se consume una molécula de CO_2 y una de ribulosa bisfosfato, ¿qué pasos se siguen en el ciclo para crear una molécula completa de glucosa?, y, ¿cómo podemos regenerar el aceptor, la ribulosa bisfosfato?

Estequiometría del ciclo de Calvin

Vamos a considerar las reacciones del ciclo de Calvin basadas en la incorporación de 6 moléculas de CO_2. Para que la RubisCO incorpore 6 moléculas de CO_2 se requieren 6 moléculas de ribulosa bisfosfato como aceptoras (Figura 17.22). Esto origina 12 moléculas de ácido 3-fosfoglicérico (un total de 36 átomos de carbono). Estas 12 moléculas sirven como esqueleto carbonado para formar 6 *nuevas* moléculas de ribulosa bisfosfato (un total de 30 átomos de carbono) y 1 molécula de hexosa para la biosíntesis celular. Una compleja serie de reorganizaciones con intermediarios C_3, C_4, C_5, C_6 y C_7 origina finalmente 6 moléculas de ribulosa 5-fosfato, que generan finalmente las 6 moléculas de ribulosa bisfosfato. El paso final en la regeneración de ribulosa bisfosfato es la fosforilación de la ribulosa 5-fosfato con ATP por la enzima *fosforribuloquinasa* (Figura 17.21*c*). Al igual que la RubisCO es exclusiva del ciclo de Calvin.

Consideremos ahora la estequiometría *global* de la conversión de 6 moléculas de CO_2 en 1 molécula de fructosa 6-fosfato (Figura 17.22). Para la reducción de 12 moléculas de ácido fosfoglicérico (PGA) a fosfogliceraldehído se requieren 12 moléculas de ATP y 12 de NADPH, y otras 6 moléculas de ATP son necesarias para la conversión de ribulosa fosfato a ribulosa bisfosfato. Por tanto, *en el ciclo de Calvin se requieren 12 NADPH y 18 ATP para sintetizar 1 molécula de hexosa a partir de 6 moléculas de* CO_2. Durante periodos en los que el ATP y el NADPH son abundantes, las moléculas de hexosa pueden convertirse en *polímeros de reserva*, como glucógeno, almidón y poli-β-hidroxialcanoatos (*véase* Sección 4.13). Estos polímeros pueden ser utilizados más tarde para construir nuevo material celular.

Carboxisomas

Algunos procariotas autotrofos que utilizan el ciclo de Calvin para la fijación de CO_2 producen inclusiones poliédricas denominadas *carboxisomas*. Estas inclusiones tienen un

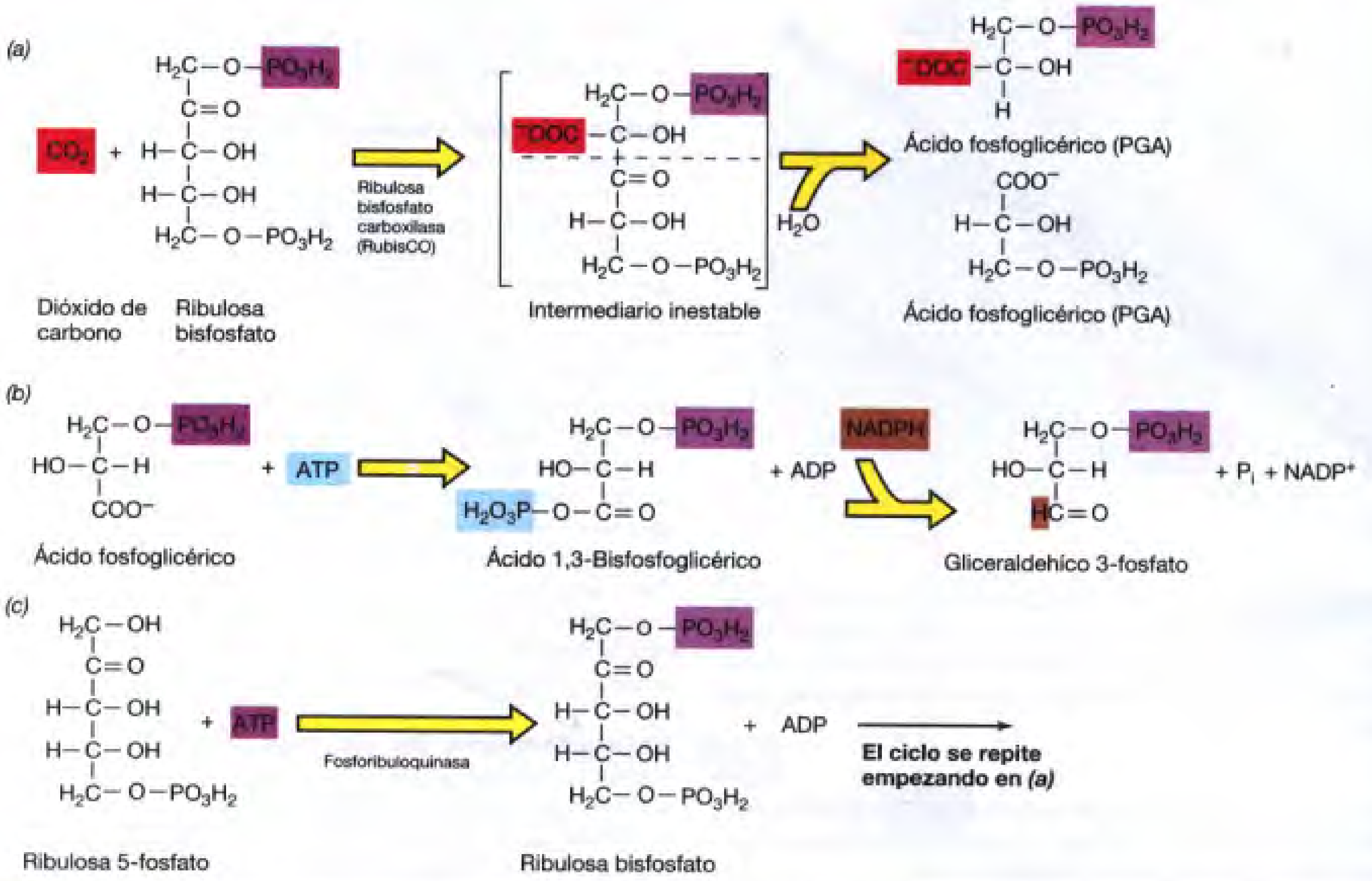

(a)
CO_2
Dióxido de carbono
Ribulosa bisfosfato
Ribulosa bisfosfato carboxilasa (RubisCO)
Intermediario inestable
H_2O
Ácido fosfoglicérico (PGA)
Ácido fosfoglicérico (PGA)
(b)
ATP
Ácido fosfoglicérico
Ácido 1,3-Bisfosfoglicérico
+ ADP
NADPH
Gliceraldehíco 3-fosfato
+ P_i + $NADP^+$
(c)
ATP
Fosforibuloquinasa
+ ADP
El ciclo se repite empezando en (a)
Ribulosa 5-fosfato
Ribulosa bisfosfato

Figura 17.21 Reacciones enzimáticas clave del ciclo de Calvin. (a) Reacción de la enzima *ribulosa bisfosfato carboxilasa*, RubisCO. (b) Pasos de la conversión del ácido 3-fosfoglicérico (PGA) a 3-fosfogliceraldehído. Obsérvese que se requiere ATP y NADPH. (c) Conversión de ribulosa 5-fosfato a ribulosa bisfosfato (molécula aceptora de CO_2) por la enzima *fosforribuloquinasa*.

diámetro de unos 100 nm, están rodeadas por una fina membrana no unitaria, y consisten en un conjunto cristalino fuertemente empaquetado de moléculas de RubisCO (Figura 17.23). Se cree que los carboxisomas constituyen un mecanismo para aumentar la cantidad de RubisCO en la célula, lo cual permite una fijación más rápida del CO_2 sin afectar la osmolaridad del citoplasma (la presión osmótica no se ve afectada porque el carboxisoma es insoluble). Se han encontrado carboxisomas en bacterias quimiolitotrofas estrictas, en oxidadoras de azufre, en bacterias nitrificantes y en cianobacterias y proclorófitos (*véanse* Secciones 12.3, 12.4, 12.26 y 12.27, respectivamente). No están presentes en los autotrofos facultativos (organismos que pueden crecer ya sea como autotrofos o como heterotrofos), como es el caso de los fototrofos anoxigénicos rojos, a pesar de que cuando crecen como fotoautotrofos utilizan el ciclo de Calvin para fijar CO_2. Con todo esto, puede que el carboxisoma sea una adaptación evolutiva a la vida bajo condiciones autotróficas estrictas.

✓ 17.6 Revisión de conceptos

En la mayoría de fototrofos y en otros organismos, la fijación de CO_2 sigue el ciclo de Calvin, donde la enzima ribulosa bisfosfato carboxilasa (RubisCO) desempeña un importante papel. El ciclo de Calvin es un proceso que consume energía y convierte el CO_2 en azúcar.

- ✓ ¿Qué reacción lleva a cabo la enzima *ribulosa bisfosfato carboxilasa*?
- ✓ ¿Por qué se necesita poder reductor para el crecimiento autotrófico?
- ✓ ¿Qué es un *carboxisoma*?

17.7 Fijación autotrófica de CO_2: ciclo inverso del ácido cítrico y ciclo del hidroxipropionato

Las bacterias verdes del azufre y no del azufre disponen de mecanismos alternativos para la fijación autotrófica de CO_2. En la bacteria verde del azufre *Chlorobium* (Figuras 17.7*a* y 17.17*b*), la fijación tiene lugar por una inversión de los pasos del ciclo del ácido cítrico (*véase* Figura 5.22), una vía metabólica conocida como *ciclo inverso del ácido cítrico* (Figura 17.24*a*). *Chlorobium* contiene dos enzimas unidas a ferredoxina que catalizan la fijación reductora de CO_2 a intermediarios del ciclo del ácido cítrico. Las dos reacciones ligadas a ferredoxina comportan la carboxilación de succi-

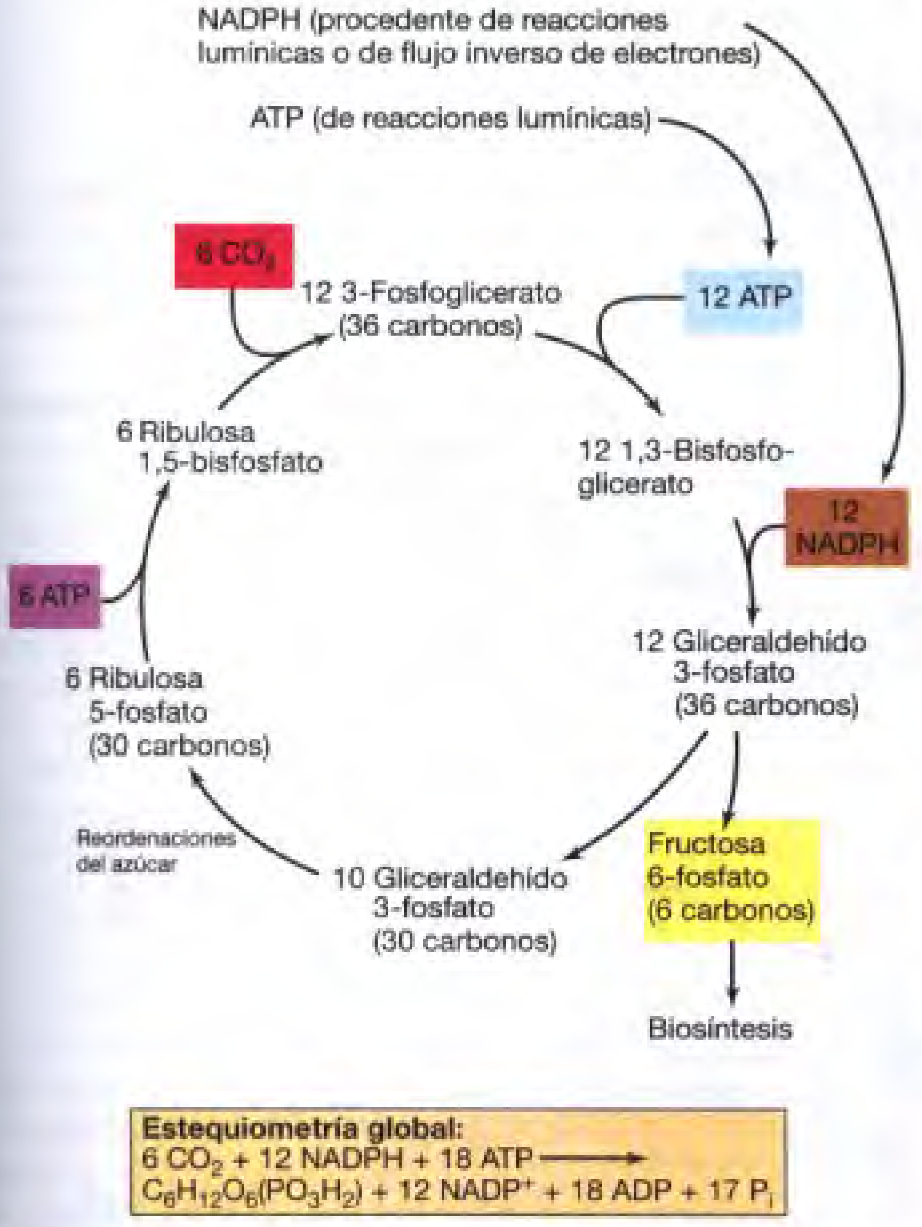

NADPH (procedente de reacciones lumínicas o de flujo inverso de electrones)
ATP (de reacciones lumínicas)
6 CO₂
12 3-Fosfoglicerato (36 carbonos)
12 ATP
6 Ribulosa 1,5-bisfosfato
12 1,3-Bisfosfoglicerato
12 NADPH
6 ATP
12 Gliceraldehído 3-fosfato (36 carbonos)
6 Ribulosa 5-fosfato (30 carbonos)
Reordenaciones del azúcar
10 Gliceraldehído 3-fosfato (30 carbonos)
Fructosa 6-fosfato (6 carbonos)
Biosíntesis
Estequiometría global:
$6\ CO_2 + 12\ NADPH + 18\ ATP \longrightarrow C_6H_{12}O_6(PO_3H_2) + 12\ NADP^+ + 18\ ADP + 17\ P_i$

Figura 17.22 Ciclo de Calvin. Por cada *seis* moléculas de CO_2 incorporadas, se produce *una* molécula de fructosa 6-fosfato. El código de colores utilizado permite el seguimiento de las reacciones que tienen lugar en la Figura 17.21.

nil-CoA a α-cetoglutarato y la carboxilación de acetil-CoA a piruvato (Figura 17.24*a*). La mayoría de las restantes reacciones del ciclo del ácido cítrico están catalizadas por enzimas que trabajan invirtiendo la dirección del ciclo oxidativo normal. Una excepción es la *citrato liasa*, una enzima dependiente de ATP que escinde el citrato en acetil-CoA y oxaloacetato en las bacterias verdes del azufre. En la dirección oxidativa del ciclo, se obtiene citrato a partir de estos mismos precursores por la enzima citrato sintasa (*véase* Figura 5.22).

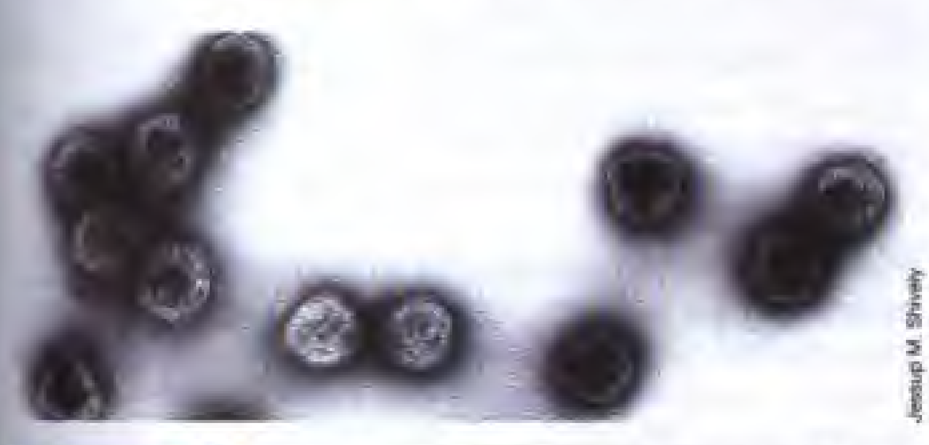

Jessup M. Shively

Figura 17.23 Carboxisomas purificados del quimiolitotrofo oxidador de azufre *Thiobacillus neapolitanus*. El diámetro de estas estructuras es de unos 100 nm.

El ciclo inverso del ácido cítrico como mecanismo de autotrofia se ha encontrado también en algunos hipertermófilos no fototrofos, como las arqueas *Sulfolobus* y *Thermoproteus* (*véase* Sección 13.9), y *Aquifex*, un autotrofo de ramificación primitiva en el árbol filogenético del dominio *Bacteria* (*véase* Figura 12.1 y Sección 12.37). Estos hallazgos abren claramente la posibilidad de que esta vía esté más extendida entre los procariotas autotróficos de lo se había pensado, y sugiere que puede estar basada en una forma «temprana» de autotrofia.

Autrofia de *Chloroflexus*

Chloroflexus, un fototrofo verde no del azufre, crece de forma autotrófica ya sea con H_2 o H_2S como donador de electrones (*véase* Sección 12.35). Sin embargo, en este organismo no operan ni el ciclo de Calvin ni el ciclo inverso del ácido cítrico. En su lugar, dos moléculas de CO_2 son reducidas a glioxilato por una vía metabólica particular, la vía del hidroxipropionato (Figura 17.24*b*). Esta vía conduce a la síntesis de hidroxipropionato como intermediario clave. Hasta ahora, la vía del hidroxipropionato sólo se ha podido confirmar en *Chloroflexus*, lo cual tiene interés evolutivo si consideramos que este organismo es la rama anoxifototrofa más primitiva en el árbol del dominio *Bacteria* (*véase* Figura 12.1). Esto sugiere que dicha vía puede haber sido el primer intento de autotrofia en fototrofos anoxigénicos y, puesto que está bastante extendida la creencia de que estos organismos evolucionaron antes que las cianobacterias, quizá se trata de la primera vía autotrófica de *cualquier* organismo fototrófico.

✓ 17.7 Revisión de conceptos

El ciclo inverso del ácido cítrico y el ciclo del hidroxipropionato son vías metabólicas de fijación de CO_2 que se encuentran en las bacterias verdes del azufre y no del azufre, respectivamente.

- ✓ Indíquense al menos tres maneras, incluida la vía de fijación de CO_2, para distinguir una bacteria roja del azufre de una bacteria verde del azufre.
- ✓ Incluyendo la vía de fijación de CO_2, ¿qué analogías y diferencias existen entre las bacterias verdes del *azufre* y *no del azufre*?

II QUIMIOLITOTROFIA: ENERGÍA A PARTIR DE LA OXIDACIÓN DE DONADORES DE ELECTRONES INORGÁNICOS

En el Capítulo 5, se han tratado los microorganismos cuyo metabolismo energético está basado en la quimioorganotrofia, que es el empleo de compuestos orgánicos como fuentes de energía. En las cuatro secciones siguientes nos centraremos en los quimiolitotrofos, destacando las estra-

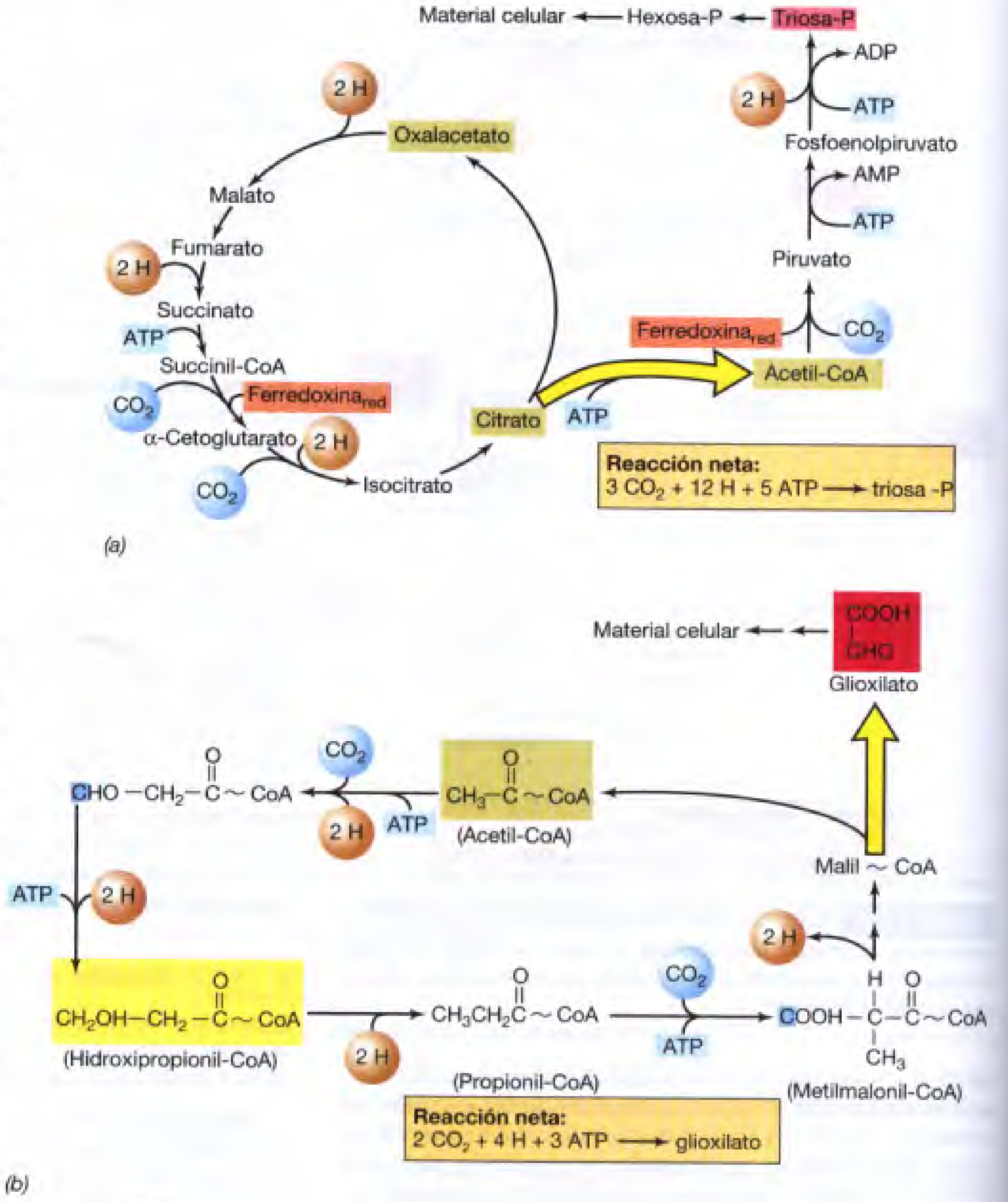

Material celular
Hexosa-P
Triosa-P
ADP
2 H
ATP
Fosfoenolpiruvato
AMP
ATP
Piruvato
Ferredoxina$_{red}$
CO_2
Acetil-CoA
Oxalacetato
2 H
Malato
Fumarato
2 H
Succinato
ATP
Succinil-CoA
CO_2
Ferredoxina$_{red}$
α-Cetoglutarato
2 H
CO_2
Isocitrato
Citrato
ATP
Reacción neta:
$3\ CO_2 + 12\ H + 5\ ATP \longrightarrow$ triosa -P
(a)
Material celular
COOH
CHO
Glioxilato
CO_2
$CHO-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim CoA$
2 H
ATP
$CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim CoA$
(Acetil-CoA)
Malil ~ CoA
ATP
2 H
2 H
$CH_2OH-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim CoA$
(Hidroxipropionil-CoA)
2 H
$CH_3CH_2\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim CoA$
(Propionil-CoA)
CO_2
ATP
$COOH-\overset{H}{C}(CH_3)-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim CoA$
(Metilmalonil-CoA)
Reacción neta:
$2\ CO_2 + 4\ H + 3\ ATP \longrightarrow$ glioxilato
(b)

Figura 17.24 Vía autotrófica exclusiva de las bacterias fototrofas verdes. (a) El ciclo inverso del ácido cítrico es el mecanismo de fijación de CO_2 en la bacteria verde del azufre *Chlorobium* (*véase* también Figura 17.17*b* y Sección 12.32). Ferredoxina$_{red}$ indica reacciones de carboxilación que precisan ferredoxina reducida (2 H cada una). *Chlorobium* produce ferredoxina reducida por reacciones impulsadas por la luz (*véase* Figura 17.18). Empezando desde el oxalacetato, cada vuelta del ciclo supone la incorporación de 3 moléculas de CO_2 y la producción de piruvato. La escisión del citrato regenera el aceptor C_4 oxalacetato y produce acetil-CoA para la biosíntesis. La conversión de piruvato a fosfoenolpiruvato consume dos equivalentes de enlaces fosfato de alta energía. (b) La vía del hidroxipropionato es el mecanismo de la autotrofia en la bacteria verde no del azufre *Chloroflexus* (*véase* Sección 12.35). El acetil-CoA se carboxila dos veces, produciendo metilmalonil-CoA. Este intermediario se reordena produciendo acetil-CoA y glioxilato. Probablemente, este último se convierte en material celular utilizando como intermediario serina o glicina.

tegias, problemas y ventajas de un estilo de vida que usa compuestos químicos *inorgánicos* como fuente de energía.

17.8 Donadores inorgánicos de electrones y energética

Los organismos que obtienen energía a partir de la oxidación de compuestos *inorgánicos* se llaman **quimiolitotrofos**. La mayoría de bacterias quimiolitotrofas son también capaces de obtener todo su carbono a partir del CO_2, de manera que también son autotrofos. Como hemos advertido, para crecer con CO_2 como única fuente de carbono un organismo necesita (1) energía (ATP) y (2) poder reductor. En los quimiolitotrofos, la generación de ATP es similar a la de los quimioorganotrofos, excepto en que el donador de electrones es *inorgánico* en vez de orgánico. La síntesis de ATP se acopla a la oxidación del *donador* de electrones. El poder reductor en los quimiolitotrofos se obtiene directamente a partir del compuesto inorgánico, si tiene un potencial de reducción suficientemente bajo, o por las reacciones de transporte inverso de electrones, como se discutió en la Sección 17.5 en el caso de las bacterias rojas fototróficas.

Fuentes de donadores de electrones inorgánicos

Hay muchas fuentes de donadores inorgánicos de electrones para los quimiolitotrofos, que pueden ser de naturaleza geológica, biológica o antropocéntrica. La actividad volcánica es uno de los principales suministros de compuestos reducidos de azufre, especialmente de H_2S. Las labores agrícolas y la minería añaden al ambiente donadores de electrones inorgánicos, sobre todo compuestos de nitrógeno y de hierro, así como la combustión de combustibles fósiles y los aportes de los desechos industriales. Los suministros biológicos son también importantes, en especial la producción de H_2S, H_2 y NH_3. El éxito ecológico (*véase* Capítulo 19) y la diversidad metabólica (en este capítulo) de los quimiolitotrofos son indicadores de la abundancia de fuentes y suministros de donadores de electrones inorgánicos en la naturaleza.

Energética de la quimiolitotrofia

La lista de potenciales de reducción que se indica en la Tabla A1.2 (Apéndice 1), revela que diversos compuestos inorgánicos pueden suministrar energía suficiente para la síntesis de ATP cuando se usa O_2 como aceptor de electrones. Recuérdese lo que se dijo en el Capítulo 5 respecto a que cuanto más apartadas estén dos semirreacciones en términos de E_0', mayor será la cantidad de energía liberada. Por ejemplo, la diferencia de potencial de reducción entre el par H^+/H_2 y el par $\frac{1}{2}O_2/H_2O$ es −1,23 V, lo que equivale a una energía libre de −237 kJ/mol (*véase* el Apéndice 1 para realizar el cálculo). Por otra parte, la diferencia de potencial entre el par H^+/H_2 y el par NO_3^-/NO_2^- es menor, −0,84 V, equivalente a una energía libre de −163 kJ/mol. Esto es todavía suficiente para la producción de ATP (el enlace del fosfato de alta energía en el ATP tiene una energía libre de unos −31,8 kJ/mol, *véase* Tabla 17.6). Sin embargo, un cálculo similar mostrará que no hay suficiente energía disponible en la oxidación de H_2S cuando se utiliza como aceptor de electrones CO_2.

A partir de estos cálculos es posible predecir los tipos de quimiolitotrofos que se pueden encontrar en la naturaleza. Como los organismos obedecen las leyes de la termodinámica, sólo las reacciones que son termodinámicamente favorables serán capaces de liberar energía potencial. La Tabla 17.1 resume la producción de energía de algunas reacciones que se sabe que llevan a cabo los microorganismos quimiolitotrofos. En este capítulo, trataremos algunos de estos procesos. Los organismos responsables se discuten en detalle en los Capítulos 12 y 13. Examinaremos también los aspectos ecológicos de la quimiolitotrofia en el Capítulo 19.

✓ 17.8 Revisión de conceptos

Los organismos quimiolitotrofos son capaces de oxidar compuestos químicos inorgánicos como única fuente de energía y poder reductor. La mayoría de los quimiolitotrofos también pueden crecer autotróficamente.

- ✓ ¿Con qué doble propósito usa un quimiolitotrofo un compuesto inorgánico determinado?
- ✓ ¿Por qué se obtiene más energía de la oxidación del H_2 cuando el aceptor de electrones es el O_2 que cuando es el SO_4^{2-}?

17.9 Oxidación del hidrógeno

El hidrógeno, H_2, es un producto bastante común del metabolismo microbiano y diversos quimiolitotrofos son capaces de usarlo como donador de electrones en el metabolismo energético. Se conoce una amplia variedad de especies anaeróbicas oxidadoras del H_2 de los dominios *Bacteria* y *Archaea* que difieren en el aceptor de electrones que usan (por ejemplo nitrato, sulfato, hierro férrico y otros). Estos organismos se tratan más adelante en este mismo capítulo (*véanse* Secciones 17.14-17.18). Aquí vamos a considerar solamente las especies *aerobias* oxidadoras de H_2. También algunas especies de bacterias H_2 pueden crecer por oxidación del monóxido de carbono ($CO + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow CO_2$), y estos organismos se han tratado en la Sección 12.5.

Energética de la oxidación del H_2

La generación de ATP durante la oxidación de H_2 es el resultado de la oxidación de H_2 por O_2 que lleva a la formación de una fuerza protón motriz. La reacción global:

$$H_2 + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O \qquad \Delta G^{0\prime} = -237\text{kJ}$$

es altamente exergónica y puede producir al menos una molécula de ATP. La reacción está catalizada por la enzima **hidrogenasa**, y los electrones del H_2 se transfieren a una quinona como aceptor. Desde aquí los electrones pasan a través de una serie de citocromos para reducir finalmente

TABLA 17.1 Rendimiento energético de la oxidación de varios donadores de electrones inorgánicos[a]

Donador de electrones	Reacción	Tipo de quimiolitotrofo	E_0' del par (V)	$\Delta G^{0\prime}$ (kJ/reacción)	Número de electrones	$\Delta G^{0\prime}$ (kJ/2 e^-)
Fosfito[b]	$4\,HPO_3^{2-} + SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow 4\,HPO_4^{2-} + HS^-$	Bacterias del fosfito	−0,69	−91	2	−91
Hidrógeno	$H_2 + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O$	Bacterias del hidrógeno	−0,42	−237,2	2	−237,2
Sulfuro	$HS^- + H^+ + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow S^0 + H_2O$	Bacterias del azufre	−0,27	−209,4	2	−209,4
Azufre	$S^0 + 1\frac{1}{2}O_2 + H_2O \rightarrow SO_4^{2-} + 2\,H^+$	Bacterias del azufre	−0,20	−587,1	6	−195,7
Ion amonio	$NH_4^+ + 1\frac{1}{2}O_2 \rightarrow NO_2^- + 2\,H^+ + H_2O$	Bacterias nitrificantes	+0,34	−274,7	6	−91,6
Nitrito	$NO_2^- + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow NO_3^-$	Bacterias nitrificantes	+0,43	−74,1	2	−74,1
Hierro ferroso	$Fe^{2+} + H^+ + \frac{1}{4}O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \frac{1}{2}H_2O$	Bacterias del hierro	+0,77	−32,9	1	−65,8

[a] Datos calculados a partir de los valores que aparecen en el Apéndice 1; los valores del Fe^{2+} son los que corresponden a pH 2, los otros a pH 7. A pH 7, la del par Fe^{3+}/Fe^{2+} es aproximadamente de +0,2 V.

[b] A excepción del fosfito, todas las reacciones se muestran con O_2 como par aceptor de electrones. El único oxidador del fosfito conocido se acopla a SO_4^{2-} como aceptor de electrones.

el O_2 a agua (Figura 17.25). Algunas bacterias del hidrógeno tienen dos hidrogenasas, una soluble y otra unida a membrana (*véase* Tabla 12.6). En este caso, la enzima unida a membrana interviene en el proceso energético, en tanto que la hidrogenasa soluble incorpora H_2 y reduce NAD^+ a NADH directamente; el potencial de reducción del H_2 (−0,42 V) es tan bajo que hace innecesario el flujo inverso de electrones para elaborar poder reductor (Figura 17.25). El microorganismo *Ralstonia eutropha* se ha usado como modelo para estudiar la oxidación aeróbica del H_2. Algunas de las propiedades de este organismo se han discutido en la Sección 12.5.

Autotrofia en las bacterias del H_2

Aunque la mayoría de las bacterias del hidrógeno son capaces de crecer como quimioorganotrofos, cuando lo hacen de forma quimiolitotrófica fijan CO_2 por el ciclo de Calvin (*véase* Sección 17.6). La estequiometría es así:

$$6\,H_2 + 2\,O_2 + CO_2 \rightarrow (CH_2O) + 5\,H_2O$$

donde (CH_2O) representa el material celular. Sin embargo, cuando hay compuestos orgánicos listos para usar, como la glucosa, es reprimida la síntesis del ciclo de Calvin y de las enzimas hidrogenasa típicas de las bacterias oxidadoras del H_2. Por tanto, en la naturaleza, cuando los niveles de H_2 en medios óxicos son pasajeros y bajos, es probable que las bacterias aerobias del hidrógeno tengan que regular estrictamente sus enzimas catabólicas y cambiar con frecuencia de quimiorganotrofas a quimiolitotrofas, dependiendo de los niveles de compuestos orgánicos y de H_2 disponibles en sus hábitat. Además, como muchas bacterias aerobias del H_2 crecen mejor en condiciones microóxicas, es posible que estos organismos prosperen más como quimiolitotrofos del H_2 en la interfase óxico/anóxico. Ahí, el H_2 procedente del metabolismo fermentativo superará en cantidad y continuidad al suministro en hábitat con condiciones altamente óxicas.

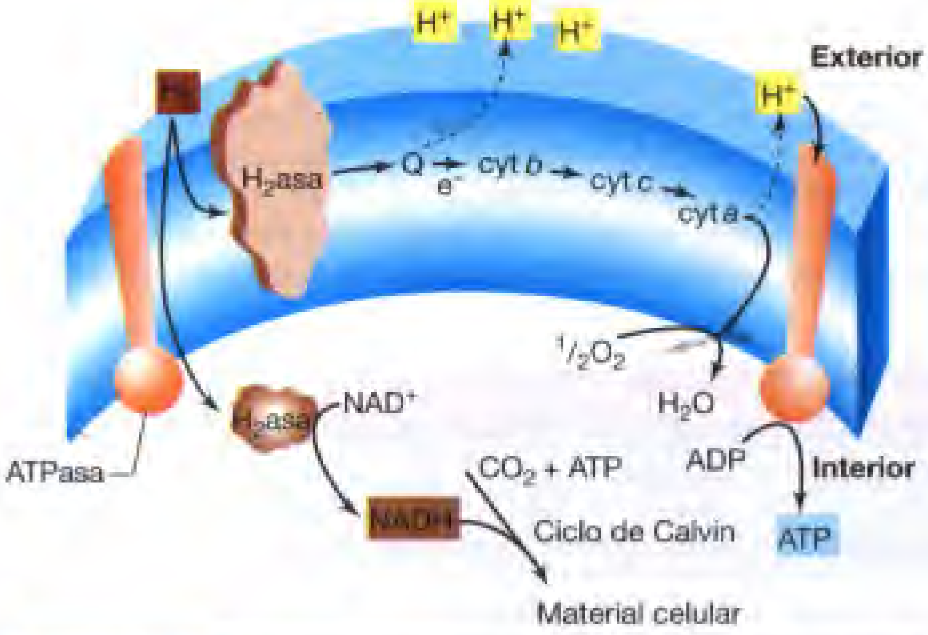


Figura 17.25 Bioenergética y funcionamiento de las dos hidrogenasas de bacterias aerobias del H_2. En *Ralstonia eutropha*, que posee dos hidrogenasas, la hidrogenasa ligada a la membrana interviene en la energética, en tanto que la hidrogenasa citoplásmica fabrica NADH para el ciclo de Calvin. Obsérvese que la hidrogenasa ligada a membrana inicia el flujo de electrones que lleva a la formación de una fuerza protón motriz. Algunas bacterias del H_2 poseen solamente la hidrogenasa ligada a membrana, y en estos organismos la síntesis de poder reductor tiene lugar a partir del flujo inverso de electrones. H_2asa, hidrogenasa; cyt, citocromo; Q, quinona.

17.10 Oxidación de compuestos reducidos del azufre

Muchos compuestos reducidos del azufre pueden ser usados como donadores de electrones por una gran variedad de bacterias incoloras del azufre. [Se denominan «incoloras» para distinguirlas de las bacterias (pigmentadas) rojas y verdes del azufre que contienen bacterioclorofila, comentadas antes en este mismo capítulo (*véase* Figura 17.17).] Recordemos que el concepto de quimiolitotrofia proviene de los estudios realizados por el gran microbiólogo ruso Winogradsky con esas bacterias (*véanse* Cuadro de texto «Winogradsky y la quimiolitotrofia» y Sección 1.6).

Energética de la oxidación del azufre

Los compuestos del azufre más comunes que se usan como fuente de energía son el sulfuro de hidrógeno (H_2S), el azufre elemental (S^0) y el tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$). En la mayor parte de los casos, el producto final de la oxidación es el sulfato (SO_4^{2-}) y el número total de electrones que intervienen entre el H_2S (estado de oxidación −2) y sulfato (estado de oxidación +6) es de ocho (*véase* Tabla 17.3 para un resumen de los estados de oxidación del azufre). Hay menos energía disponible cuando se usa uno de los estados de oxidación intermediarios:

$$H_2S + 2\,O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+ \qquad \Delta G^{0\prime} = -798{,}2 \text{ kJ/reacción}$$

$$HS^- + \tfrac{1}{2}\,O_2 + H^+ \rightarrow S^0 + H_2O \qquad -209{,}4 \text{ kJ/reacción}$$

$$S^0 + H_2O + 1\tfrac{1}{2}\,O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+ \qquad -587{,}1 \text{ kJ/reacción}$$

$$S_2O_3^{2-} + H_2O + 2\,O_2 \rightarrow 2\,SO_4^{2-} + 2H^+ \qquad -818{,}3 \text{ kJ/reacción} \quad (-409{,}1 \text{ kJ/átomo S oxidado})$$

La oxidación del compuesto más reducido de azufre, H_2S, ocurre en fases, y el primer paso de oxidación origina la formación de azufre elemental, S^0. Algunas bacterias oxidadoras de H_2S depositan el azufre elemental que se forma dentro de la célula (Figura 17.26*a*). El azufre depositado como resultado de la oxidación inicial es una reserva de energía, y cuando se agota el suministro de H_2S, se puede obtener energía adicional mediante la oxidación del azufre a sulfato.

Cuando se suministra externamente azufre elemental como donador de electrones, el organismo debe crecer uni-

Aprendiendo del pasado... Winogradsky y la quimiolitoautotrofia

El concepto de autotrofia quimiolitotrófica lo desarrolló inicialmente Sergei Winogradsky, el gran microbiólogo ruso. Winogradsky estudió las bacterias del azufre porque algunas bacterias incoloras del azufre (*Beggiatoa*, *Thiothrix*) son muy grandes (*véase* Figura 1) y por tanto fáciles de investigar aunque no estén en cultivo axénico. Los manantiales de aguas ricas en H_2S son muy comunes por todo el mundo, y él estudió varios de esos manantiales en el distrito Bernese Oberland de Suiza. En los canales de desagüe de las fuentes sulfurosas se desarrollaban grandes poblaciones de *Beggiatoa* y *Thiothrix*, y podía obtenerse un buen material para análisis microscópicos y fisiológicos sencillamente cogiéndolo de las blancas masas filamentosas (*véanse* Sección 12.4 y Figuras 12.11 y 12.13).

Winogradsky demostró primero que las bacterias incoloras del azufre estaban presentes sólo en aguas que contenían H_2S. A medida que las aguas se alejaban de la fuente, el H_2S se volatilizaba gradualmente y las bacterias del azufre desaparecían. Esto le sugirió que su desarrollo dependía de la presencia de H_2S. Winogradsky demostró luego que manteniendo filamentos de *Beggiatoa* sin alimentar por un tiempo, perdían los gránulos de azufre; no obstante, vio que los gránulos se recuperaban rápidamente si se añadía una pequeña cantidad de H_2S (Figura 1). Concluyó, por tanto, que el H_2S se oxidaba a azufre elemental. ¿Pero qué ocurría con los gránulos de azufre cuando los filamentos se mantenían en ayuno de H_2S? Mediante pruebas microquímicas muy ingeniosas Winogradsky demostró que cuando desaparecían los gránulos de azufre aparecía sulfato en el medio. En consecuencia, formuló la idea de que *Beggiatoa* (y por extensión otras bacterias incoloras del azufre) oxidan H_2S a azufre elemental y luego a sulfato ($H_2S \rightarrow S^0 \rightarrow SO_4^{2-}$). Como parecía que necesitaban H_2S para su desarrollo en los manantiales, postuló que esta oxidación era la principal fuente de *energía* para estos microorganismos.

Los estudios con *Beggiatoa* fueron por tanto la primera confirmación de que un organismo podía oxidar una sustancia *inorgánica* como fuente de energía, y éste fue el origen del concepto de la quimiolitotrofia. A partir de este comienzo, Winogradsky se dedicó a las bacterias nitrificantes, siendo en este grupo donde demostró claramente que la fijación autotrófica de CO_2 estaba acoplada a la oxidación de un compuesto inorgánico. El proceso de nitrificación se conocía con anterioridad al trabajo de Winogradsky por estudios sobre el destino de los residuos cuando se añadían al suelo. Por ejemplo, al pasar los residuos ricos en amoníaco a través de una columna de suelo, este compuesto se convertía en nitrato. Winogradsky procedió a aislar las bacterias nitrificantes usando medios de cultivo completamente minerales donde el CO_2 era la única fuente de carbono y el amoníaco el único donador de electrones. Como el amoníaco es estable químicamente, resultó fácil mostrar que la oxidación de amoníaco a nitrito, y finalmente a nitrato, era un proceso estrictamente bacteriano. De hecho, Winogradky demostró más adelante que la nitrificación es un proceso que tiene lugar en *dos pasos*, con un grupo de organismos que convierten NH_4^+ en NO_2^- y un segundo, que convierte NO_2^- en NO_3^- (*véase* Sección 17.12). Como en el medio no estaban presentes sustancias orgánicas, también se pudo demostrar que la materia orgánica (el material celular bacteriano) se formaba a partir de CO_2 únicamente. Cuando el amoníaco o el nitrito se excluían del medio, no había crecimiento. Análisis químicos cuidadosos mostraron que la cantidad de materia orgánica formada por las bacterias era proporcional a la cantidad de amoníaco o nitrito que oxidaban. Winogradsky concluyó: «Este [proceso] contradice la doctrina fundamental de la fisiología que afirma que no puede haber síntesis de materia orgánica en la naturaleza si no es a través de las plantas con clorofila por acción de la luz». No obstante, al menos de un modo, la autotrofia es similar en la mayor parte de los quimiolitotrofos y en los fototrofos: en ambos casos la vía de fijación del CO_2 sigue los mismos pasos bioquímicos (el ciclo de Calvin), requiriendo la enzima ribulosa bisfosfato carboxilasa (*véase* Sección 17.7). ■

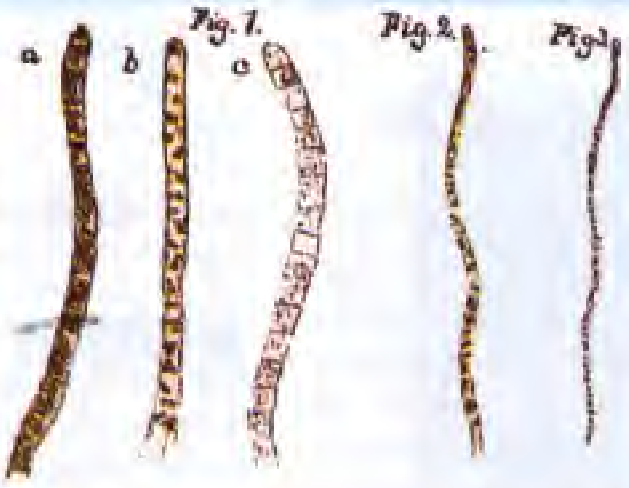
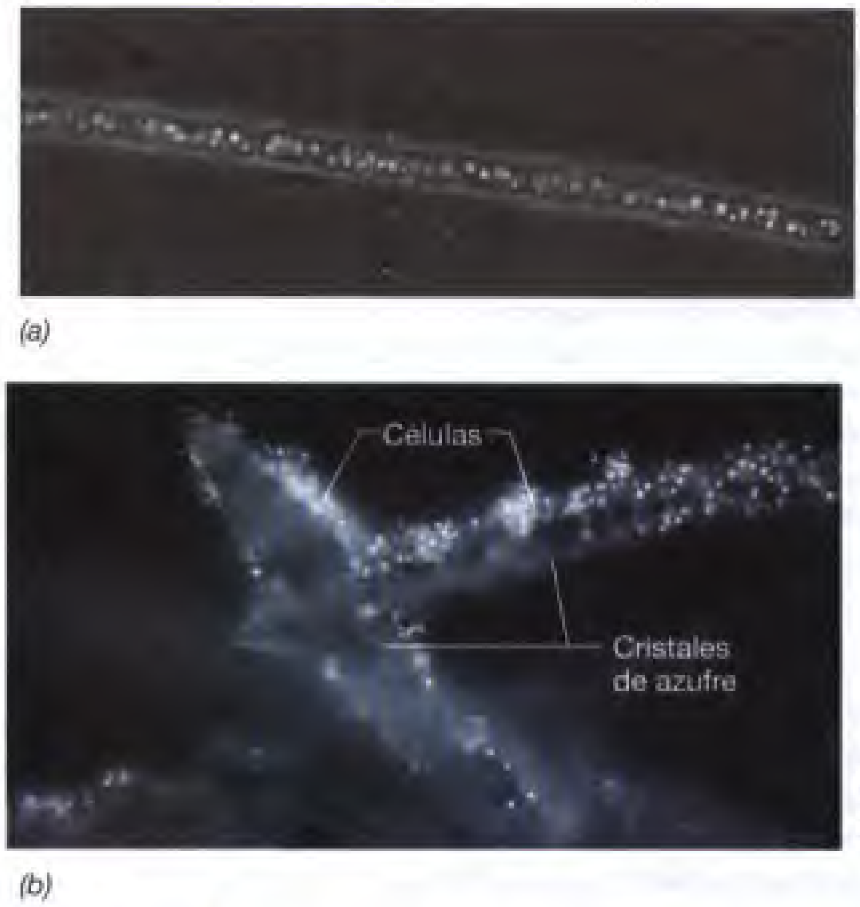


Fig. 1.
a
b
c
Fig. 2.
Fig. 3.

Figura 1 Dibujos de *Beggiatoa* hechos por Winogradsky y traducción (del francés) de la leyenda que acompañaba estas figuras. «Figura 1. Extremo de un filamento de *Beggiatoa alba*: (a) en agua sulfurosa [conteniendo sulfuro], (b) tras 24 horas en agua en ausencia de H_2S, (c) tras 48 horas en agua sin H_2S [*véase* la desaparición de los gránulos de azufre con el tiempo]. Figura 2. Extremo de un filamento de *Beggiatoa media*. Figura 3. Extremo de un filamento de *Beggiatoa minima*.» De Winogradsky, S. 1949. *Microbiologie du Sol*. Masson, Paris.

do a la partícula de azufre debido a la gran insolubilidad del azufre elemental (Figura 17.26*b*). Adhiriéndose a la partícula, el organismo puede obtener eficazmente los átomos de azufre que necesita. Se cree que este proceso tiene lugar gracias a la acción de proteínas de membrana o del periplasma que solubilizan el azufre, probablemente por reducción de S^0 a SH^-, que es transportado a la célula y entra en el metabolismo quimiolitotrófico.

Uno de los productos de las reacciones de oxidación de azufre que se muestran aquí es el H^+. La producción de protones da lugar a un descenso del pH, por lo que un resultado de la oxidación de compuestos reducidos de azu-


(a)
Células
Cristales de azufre
(b)

T.D. Brock

Figura 17.26 Bacterias del azufre. (a) Acumulación de gránulos internos de azufre en *Beggiatoa*. (b) Unión a un cristal de azufre elemental de la arquea oxidante de azufre *Sulfolobus acidocaldarius*. Observado por microscopía de fluorescencia tras tinción de las células con el colorante naranja de acridina. El cristal de azufre no emite fluorescencia.

fre es la acidificación del medio. El ácido formado por las bacterias del azufre es *ácido sulfúrico*, H_2SO_4, y estas bacterias originan con frecuencia una notable disminución del pH del medio.

Bioquímica y energética de la oxidación del azufre

La bioquímica de la oxidación de varios compuestos de azufre se resume en la Figura 17.27. Si se inicia con sulfuro, se produce sulfito (SO_3^{2-}), una oxidación de seis electrones. Si el S^0 es el sustrato inicial, se produce también sulfito, aunque el S^0 tiene que reducirse primero a sulfuro (Figura 17.27*a*). Hay dos maneras de oxidar SO_3^{2-} a SO_4^{2-}. La más frecuente es aquella en la que interviene la enzima *sulfito oxidasa*. Esta enzima transfiere electrones directamente de SO_3^{2-} al citocromo *c*, produciéndose ATP durante el transporte de electrones y fuerza protón motriz (Figura 17.27*b*). Además de la sulfito oxidasa, un número reducido de quimiolitotrofos oxidan SO_3^{2-} a SO_4^{2-}vía inversión de la *adenosina fosfosulfato reductasa* (APS), una enzima crítica en el metabolismo de las bacterias sulfato reductoras (compárese Figuras 17.27*a* y 17.38). Esta reacción, que sigue la dirección de la producción de SO_4^{2-} en los quimiolitotrofos del azufre, produce un enlace fosfato de alta energía al convertir AMP en ADP (Figura 17.27*a*). Cuando el tiosulfato es el donador de electrones para los quimiolitotrofos del azufre, se escinde en S^0 y SO_3^{2-}, y ambos son finalmente oxidados a SO_4^{2-}.

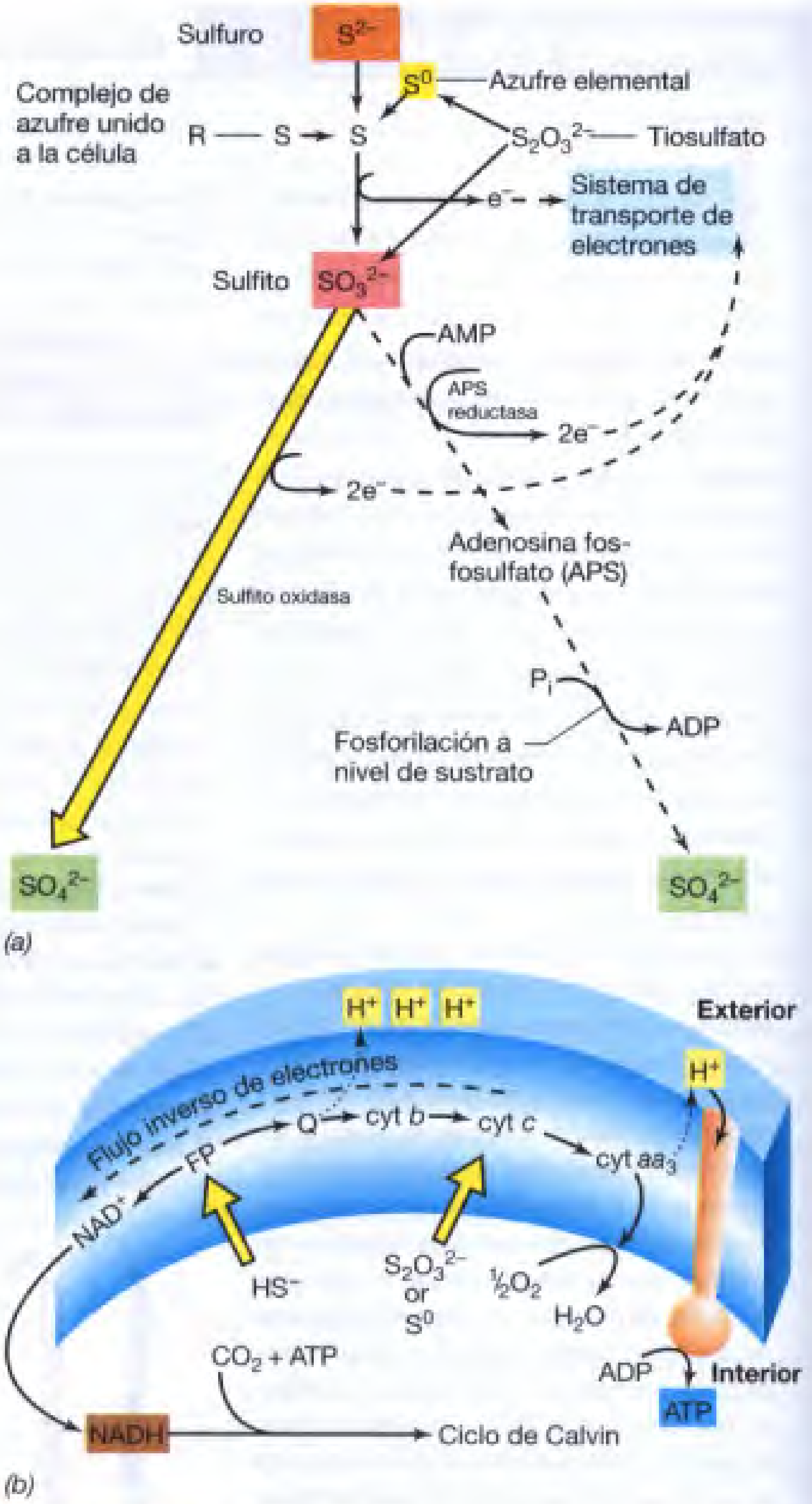

Sulfuro
S^{2-}
S^0
Azufre elemental
Complejo de azufre unido a la célula
R — S → S
$S_2O_3^{2-}$
Tiosulfato
e^-
Sistema de transporte de electrones
Sulfito
SO_3^{2-}
AMP
APS reductasa
$2e^-$
$2e^-$
Adenosina fosfosulfato (APS)
Sulfito oxidasa
P_i
ADP
Fosforilación a nivel de sustrato
SO_4^{2-}
SO_4^{2-}
(a)
H⁺ H⁺ H⁺
Exterior
H⁺
Flujo inverso de electrones
Q
cyt *b*
cyt *c*
cyt aa_3
FP
NAD⁺
HS⁻
$S_2O_3^{2-}$ or S^0
½O_2
H_2O
CO_2 + ATP
ADP
Interior
ATP
NADH
Ciclo de Calvin
(b)

Figura 17.27 Oxidación en compuestos reducidos de azufre por quimiolitotrofos del azufre. (a) Pasos en la oxidación de diferentes compuestos. La vía de la sulfito oxidasa es responsable de la mayoría del sulfito oxidado. (b) Los electrones de los compuestos de azufre alimentan la cadena de transporte de electrones para obtener una fuerza protón motriz; los electrones del tiosulfato y azufre elemental entran en el nivel de citocromo *c*. El NADH tiene que ser producido por reacciones endergónicas del flujo inverso de electrones, ya que los donadores de electrones tienen un E_0' más electropositivo que el NAD^+/NADH. Cyt, citocromo; FP, flavoproteína y Q, quinona.

Todos los electrones de los compuestos reducidos de azufre entran finalmente en la cadena de transporte de electrones, como se muestra en la Figura 17.27*b*. Dependiendo de la E_0' del par, los electrones entran bien en el nivel de la flavoproteína ($E_0' = \sim -0{,}2$ V) o bien en el del citocromo *c* ($E_0' = +0{,}3$ V) y son transportados al O_2, lo que genera una fuerza protón motriz que lleva a la síntesis de ATP por la ATPasa. Los electrones para la fijación autotrófica de CO_2 provienen del flujo inverso de electrones (*véase* Sección 17.5), que finalmente produce NADH y el CO_2 se fija vía ciclo de Calvin (Figura 17.27*b*). Aunque los quimiolitotrofos del azufre son principalmente un grupo aerobio (*véase* Sección 12.4), algunas especies crecen anaeróbicamente usando nitrato como aceptor de electrones; *Thiobacillus denitrificans* es un ejemplo clásico de este estilo de vida.

✓ 17.9-17.10 Revisión de conceptos

El hidrógeno (H_2) y los compuestos reducidos de azufre tales como H_2S y el S^0 son excelentes donadores de electrones para los quimiolitotrofos. Estos compuestos pueden ser oxidados por las bacterias del hidrógeno o las del azufre, respectivamente, generando una fuerza protón motriz y síntesis de ATP. Estos quimiolitotrofos son también autotrofos y fijan CO_2 por el ciclo de Calvin.

- ✓ ¿Cuál es la enzima especial necesaria para crecer en H_2?
- ✓ ¿Cuántos electrones están disponibles a partir de la oxidación de H_2S si S^0 es el producto final? ¿Y si lo es SO_4^{2-}?

17.11 Oxidación del hierro

La oxidación aeróbica del hierro del estado ferroso (Fe^{2+}) al férrico (Fe^{3+}) es una reacción productora de energía para algunas bacterias. La cantidad de energía disponible de esta oxidación es muy pequeña (*véase* Tabla 17.1) y, por esta razón, las bacterias del hierro deben oxidar grandes cantidades de hierro para desarrollarse. El hierro férrico obtenido forma hidróxido férrico [$Fe(OH)_3$] insoluble, que precipita en el agua (Figura 17.28*a*). Esto se debe en parte a que a pH neutro el hierro ferroso se oxida rápidamente de forma no

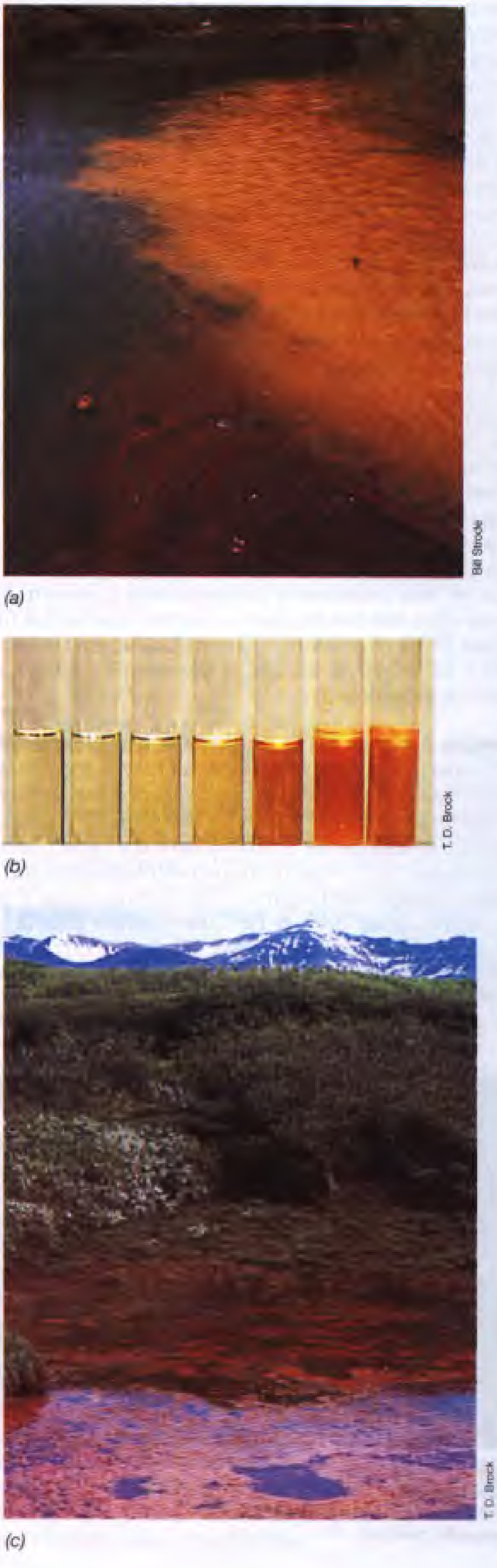


Figura 17.28 Bacterias oxidadoras de hierro. (a) Vertidos ácidos mineros, mostrando la confluencia de un río normal y un arroyo de drenaje de una zona minera de carbón. El arroyo contiene altas concentraciones de hierro ferroso. A valores bajos de pH, el hierro ferroso no se oxida espontáneamente en el aire, pero *Thiobacillus ferrooxidans* realiza la oxidación. El hidróxido férrico insoluble y las sales férricas complejas precipitan, formando un barro amarillo. (b) Cultivo de *Thiobacillus ferrooxidans*. Se muestra una serie de diluciones, sin crecimiento en el tubo de la izquierda y con aumento de crecimiento de izquierda a derecha. El crecimiento se pone de manifiesto por la producción de Fe^{3+}, que forma rápidamente $Fe(OH)_3$, dando lugar al color amarillo anaranjado. (c) Desarrollo de hidróxido férrico insoluble en una pequeña charca de una turbera en Islandia. Depósitos de hierro como éste están muy distribuidos en las zonas frías del mundo y son los equivalentes actuales de los extensos depósitos de hierro de eras geológicas pasadas. Esos antiguos almacenamientos constituyen en la actualidad muchas minas de hierro que son explotadas comercialmente. En el suelo de la turbera saturado de agua, bacterias aerobias facultativas reducen el hierro desde su estado férrico a estado ferroso, que es más soluble. El hierro ferroso se va lixiviando al área de drenaje que rodea la turbera, donde se oxida de nuevo, bien sea espontáneamente, o por bacterias oxidantes del hierro (*Gallionella* o *Leptothrix*), y se forma el depósito de hidróxido férrico insoluble.

biológica al estado férrico, por lo que el estado ferroso sólo resulta estable durante periodos prolongados bajo condiciones anóxicas. A pH ácido, sin embargo, el hierro ferroso es estable en condiciones óxicas. Ésta es la explicación de por qué la mayoría de las bacterias oxidadoras de hierro son acidófilas estrictas.

Las bacterias oxidadoras de hierro más conocidas son *Thiobacillus ferrooxidans* y *Heptospirillum ferrooxidans*; ambas pueden crecer autotróficamente usando hierro ferroso (Figura 17.28*b*) como donador de electrones. Estos organismos son muy comunes en medios con contaminación ácida, como las escorrentías de las minas de carbón (Figura 17.28*a*). En las Secciones 19.14 y 19.16, se discutirá en detalle la función de esos organismos en la contaminación ácida por los efluentes de minas y en la oxidación de minerales.

A pesar de la inestabilidad del Fe^{2+} a pH neutro, hay bacterias oxidadoras del hierro que prosperan en esos medios, pero son situaciones en las que el hierro ferroso se desplaza desde condiciones anóxicas a las óxicas. En la interfase entre estas zonas, las bacterias del hierro pueden oxidar Fe^{2+} cuando proviene de una fuente anóxica, antes de que el Fe^{2+} se oxide espontáneamente. *Gallionella ferruginea* y *Sphaerotilus natans* son ejemplos de organismos que viven en esas interfases y generalmente aparecen mezcladas en ellas con los depósitos característicos que forman (Figura 17.29; *véase* también Figura 12.43*a*). En las Secciones 12.15 y 12.16 hemos tratado la taxonomía de estos interesantes organismos.

Energía a partir de la oxidación del hierro ferroso

La bioenergética de la oxidación del hierro por *Thiobacillus ferrooxidans* tiene interés a causa del potencial de reducción tan electropositivo del par Fe^{3+}/Fe^{2+} (+0,77 V a pH 2). La cadena respiratoria de *T. ferrooxidans* contiene citocromos de los tipos *c* y *a*, y una proteína periplasmática con cobre llamada *rusticianina* (Figura 17.30). Debido a que el potencial de reducción del par Fe^{3+}/Fe^{2+} es tan alto, la vía de transporte de electrones hacia el oxígeno ($\frac{1}{2}$ O_2/H_2O, $E_0' = +0{,}82$ V) es evidentemente muy corta. La oxidación del hierro empieza en el periplasma, donde la rusticianina oxida Fe^{2+} a Fe^{3+}, una transición de un electrón. Esta proteína reduce entonces el citocromo *c*, el cual, consecuentemente, reduce el citocromo *a*. Este último interacciona directamente con O_2 para formar H_2O (Figura 17.30). El ATP es sintetizado en la membrana por las ATPasas translocadoras de protones, y la producción de ATP es relativamente baja debido al elevado potencial del donador de electrones.

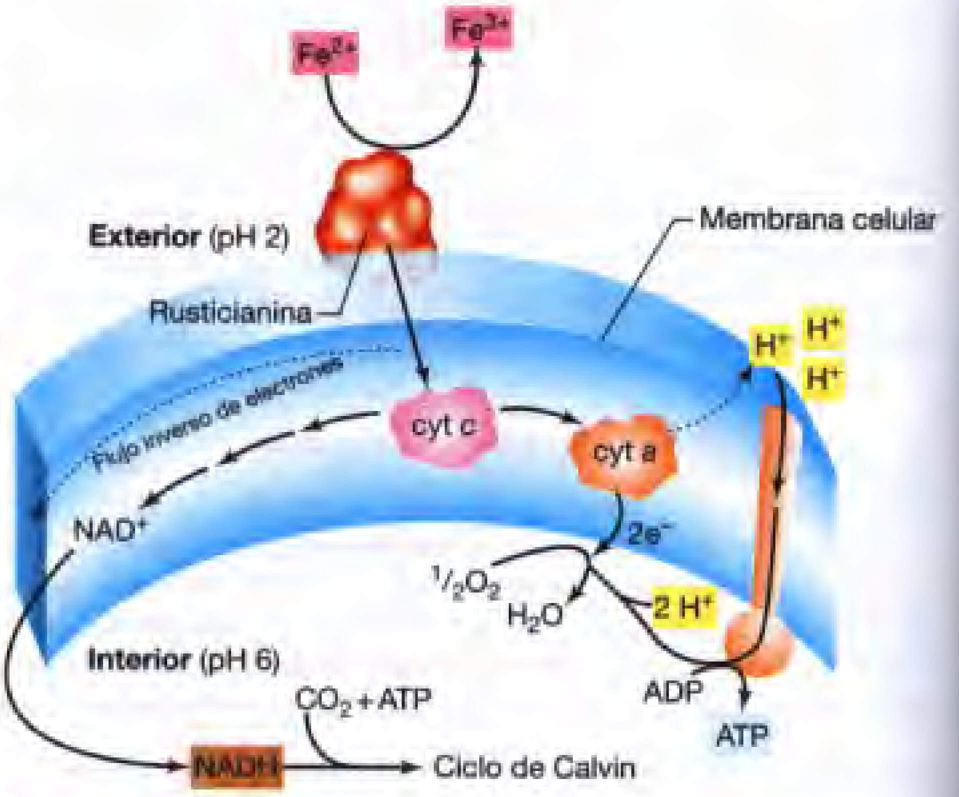
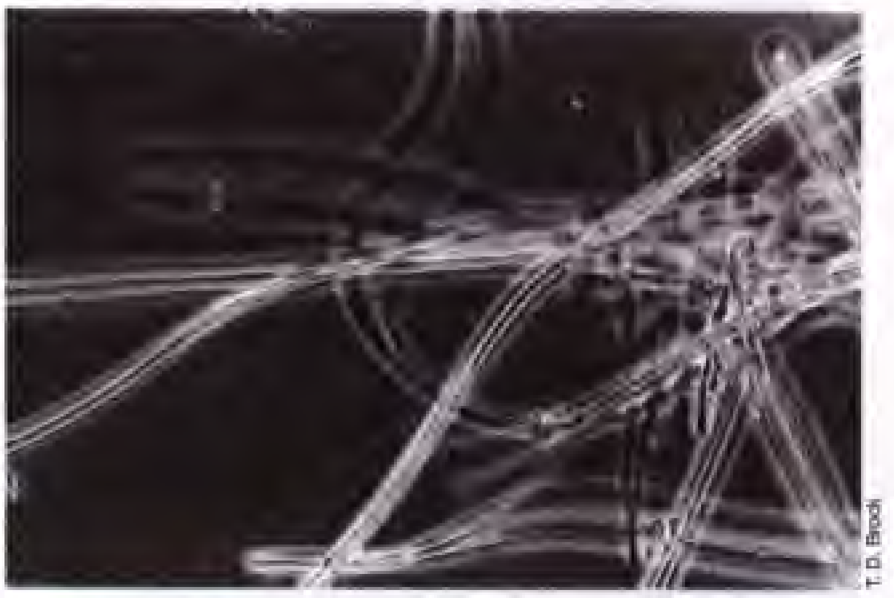


Figura 17.30 Flujo de electrones durante la oxidación de Fe^{2+} por el acidófilo *Thiobacillus ferrooxidans*. La proteína periplasmática rusticianina, que contiene cobre, es el aceptor intermediario de electrones de Fe^{2+}. Desde aquí, los electrones se mueven a través de una cadena corta de transporte de electrones, reduciendo finalmente el O_2 a H_2O. El poder reductor para el ciclo de Calvin proviene de las reacciones del flujo inverso de electrones. Nótese el pronunciado gradiente de pH (4-5 unidades) a través de la membrana.



T. D. Brock

Figura 17.29 Micrografía de contraste de fases de vainas vacías con incrustaciones de hierro de *Sphaerotilus*, recogido en el borde de un pequeño pantano.

Debido al elevado gradiente natural de protones a través de la membrana de *T. ferrooxidans* (el pH del periplasma es de 1 a 2, mientras que el del citoplasma es de PH 5.5 a 6), los protones que entran en el citoplasma vía las ATPasas tienen que ser consumidos para mantener el pH interno dentro de unos límites aceptables (Figura 17.30). Los protones se consumen durante la producción de H_2O, pero esta reacción requiere también electrones; éstos provienen del Fe^{2+}, según la siguiente reacción:

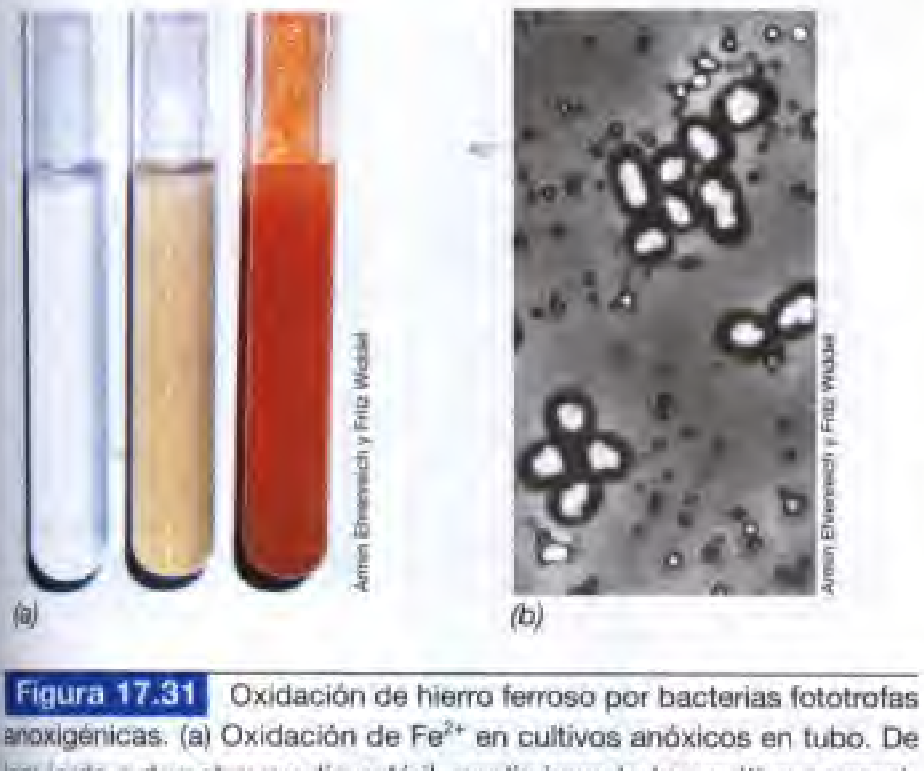
$$2\,Fe^{2+} + \tfrac{1}{2}\,O_2 + 2\,H^+ \rightarrow 2\,Fe^{3+} + H_2O$$

Por tanto, mientras *T. ferrooxidans* disponga de Fe^{2+}, la síntesis de ATP se produce principalmente a expensas de la fuerza protón motriz natural existente a través de la membrana citoplasmática (Figura 17.30).

La autotrofia en *T. ferrooxidans* está impulsada por el ciclo de Calvin. A causa del elevado potencial del donador de electrones, el Fe^{2+}, gran parte de la energía es consumida en las reacciones del transporte inverso de electrón para obtener el poder reductor necesario para la fijación de CO_2. De esta forma, una energía relativamente pobre acoplada a grandes demandas energéticas hace que *T. ferrooxidans* tenga que oxidar grandes cantidades de Fe^{2+} para producir incluso cantidades pequeñas de material celular. Por tanto, en los ambientes donde viven bacterias acidófilas oxidadoras de Fe^{2+}, su presencia viene señalada no por la formación de gran cantidad de material celular sino por la acumulación de grandes cantidades de hierro férrico (*véase* Figuras 17.28 y 19.37). Los procesos ecológicos relacionados con las bacterias oxidadoras de hierro se tratan en las Secciones 19.14 y 19.16.

Oxidación del hierro ferroso por fototrofos anoxigénicos

El hierro ferroso puede oxidarse en condiciones *anóxicas* por algunas bacterias fototrofas anoxigénicas (Figura 17.31). En este caso, el hierro ferroso no se usa como donador de electrones en el metabolismo energético, sino como donador de electrones para la reducción del CO_2 (autotrofia). A pH neutro, el par Fe^{3+}/Fe^{2+} es mucho menos electropositivo que a pH 2, alrededor de +0,2 V, y los electrones de Fe^{2+} pueden reducir el citocromo *c* en el fotosistema de las bacterias rojas (*véase* Sección 17.5 para una discusión de la fotosíntesis anoxigénica). Los organismos que intervienen, que son especies de bacterias rojas fotosintéticas (Figura 17.31*b*), también pueden usar FeS; en estas condiciones, tanto el Fe^{2+} como el S^{2-} son oxidados como donadores de electrones. Algunas bacterias fototrofas verdes del azufre (género *Chlorobium*, *véase* Sección 12.33) también usan Fe^{2+} como donador fotosintético de electrones. Además, se han aislado varias especies de bacterias desnitrificantes quimiotróficas capaces de acoplar la oxidación de Fe^{2+} con la reducción de NO_3^- a N_2 y de crecer en condiciones anóxicas. Sin embargo, al igual que las bacterias aeróbicas del hierro, en estos organismos el hierro es un donador de electrones *tanto* para los requerimientos de energía *como* para los de poder reductor.



Armin Ehrenreich y Fritz Widdel

Armin Ehrenreich y Fritz Widdel

Figura 17.31 Oxidación de hierro ferroso por bacterias fototrofas anoxigénicas. (a) Oxidación de Fe^{2+} en cultivos anóxicos en tubo. De izquierda a derecha: medio estéril, medio inoculado y cultivo en crecimiento. El color pardo rojizo se debe principalmente a precipitados de $Fe(OH)_3$. (b) Micrografía de contraste de fases de una bacteria roja oxidadora de hierro. Las áreas refráctiles brillantes dentro de las células son vesículas de gas (*véase* Sección 4.14). Los gránulos fuera de la célula son precipitados de hierro. Este microorganismo está relacionado filogenéticamente con la bacteria roja del azufre *Chromatium* (*véase* Sección 12.2).

El descubrimiento de fototrofos oxidadores de Fe^{2+} tiene importantes implicaciones tanto para entender la evolución de la fotosíntesis como para explicar los grandes depósitos de hierro férrico presentes en sedimentos antiguos. Antes se pensaba que ese hierro férrico se había formado por la oxidación de Fe^{2+} debido al O_2 producido por los fototrofos oxigénicos (*véase* Sección 11.1). Sin embargo, debido a la edad de tales sedimentos, es más probable que el hierro férrico se formara por la acción de los fototrofos anoxigénicos que oxidaron el Fe^{2+} en ambientes anóxicos.

✓ 17.11 Revisión de conceptos

Las bacterias del hierro son quimiolitotrofos capaces de usar el hierro ferroso (Fe^{2+}) como única fuente de energía. La mayor parte crece sólo a pH ácido y a menudo se presentan asociadas a la contaminación ácida derivada de actividades mineras de carbón y otras. Algunas bacterias fototrofas rojas oxidan Fe^{2+} a Fe^{3+} anaeróbicamente.

- ✓ ¿Por qué a pH ácido se obtiene sólo una cantidad muy pequeña de energía de la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+}?
- ✓ ¿Cuál es la función de la *rusticianina* y en qué lugar de la célula se encuentra?
- ✓ ¿Cómo se puede oxidar anaeróbicamente el Fe^{2+}?

17.12 Nitrificación y anamox

Los *compuestos nitrogenados inorgánicos* más comunes que se usan como donadores de electrones son el amoníaco (NH_3) y el nitrito (NO_2^-), que se oxidan aeróbicamente por la acción de las **bacterias nitrificantes** quimiolitotrofas (*véase* Sección 12.3). Las bacterias nitrificantes están ampliamente distribuidas en suelos y aguas. Un grupo de microorganismos, los *nitrosoficantes* (*Nitrosomonas* es uno de los géneros), oxidan amoníaco a nitrito, y otro grupo (*Nitrobacter*) oxida nitrito a nitrato. La oxidación completa de amoníaco a nitrato, una transferencia de ocho electrones, es llevada a cabo por miembros de estos dos grupos de organismos que actúan secuencialmente (*véase* Cuadro de texto «Winogradsky y la quimiolitotrofia»).

Bioenergética y enzimología de la nitrificación

Los electrones de los compuestos nitrogenados entran en una cadena de transporte de electrones, y el flujo de electrones establece un potencial de membrana y una fuerza protón motriz que producen ATP. Sin embargo, debido al potencial de reducción de sus donadores de electrones, las bacterias nitrificantes se enfrentan a problemas bioenergéticos similares a las de las quimiolitotrofas del azufre. El E_0'del par NO_2^-/NH_3, el primer paso en la oxidación de NH_3, es + 0,34 V. El E_0' del par NO_3^-/NO_2^- es mayor, alrededor de +0,43 V. Estos potenciales de reducción relativamente altos determinan que las bacterias nitrificantes tengan que donar electrones a sus cadenas de transporte de electrones en los últimos pasos del proceso global. Esto limita mucho la cantidad de ATP que puede obtenerse de cada par de electrones introducidos.

Hay varias enzimas clave relacionadas con la oxidación de compuestos nitrogenados reducidos. En las bacterias oxidadoras de amoníaco, el NH_3 se oxida por la **amoníaco monooxigenasa** (*véase* Sección 17.22 para una discusión de las enzimas monooxigenasa), que produce NH_2OH y H_2O (Figura 17.32). Después, la *hidroxilamina oxidorreductasa* oxida NH_2OH a NO_2^- y se obtienen *cuatro* electrones del proceso. La amoníaco monooxigenasa es una proteína que forma parte de la membrana, mientras que la hidroxilamina oxidorreductasa es periplasmática (Figura 17.32). En la reacción que lleva a cabo la amoníaco monooxigenasa,

$$NH_3 + O_2 + 2\,H^+ + 2\,e^- \rightarrow NH_2OH + H_2O$$

se requiere el suministro exógeno de dos electrones más dos protones para reducir un átomo de dioxígeno a agua. Estos electrones se originan en la oxidación de la hidroxilamina, y son suministrados a la amoníaco monooxigenasa a partir de la hidroxilamina oxidorreductasa mediante el citocromo *c* y la ubiquinona (Figura 17.32). Es así como por cada cuatro electrones generados en la oxidación de NH_3 a NO_2^-, sólo dos llegan realmente a la oxidasa terminal (citocromos *aa*$_3$, Figura 17.32).

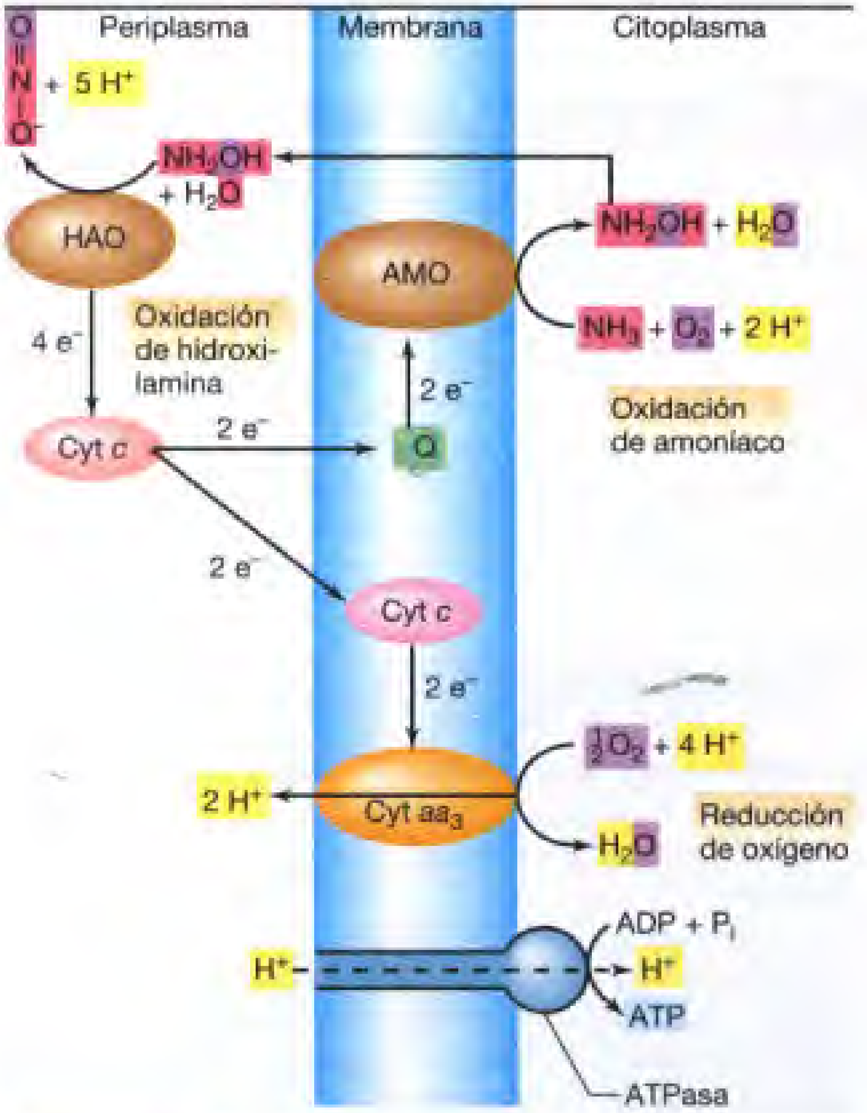


Figura 17.32 Oxidación de amoníaco y flujo de electrones en bacterias oxidadoras de amoníaco. Se destacan los reactantes y los productos de esta serie de reacciones. El citocromo c (cyt c) en el periplasma es una forma diferente del cyt c de la membrana. AMO, amoníaco monooxigenasa; HAO, hidroxilamina oxidorreductasa y Q, ubiquinona.

Las bacterias oxidadoras de nitritos emplean la enzima *nitrito oxidorreductasa* para oxidar el nitrito a nitrato, con los electrones viajando a través de una cadena de electrones muy corta (debido al elevado potencial del par NO_3^-/NO_2^-) hasta la oxidasa terminal (Figura 17.33). En las cadenas de transporte de electrones de los oxidadores de nitritos están presentes citocromos de tipo *a* y *c*, y la generación de la fuerza motriz de protones (que, en última instancia, dirige la síntesis de ATP) ocurre por la acción de los citocromos *aa*$_3$ (Figura 17.33). Como en el caso de la oxidación del hierro (*véase* Sección 17.11), sólo se obtienen pequeñas cantidades de energía, por lo que el crecimiento neto de las bacterias nitrificantes es relativamente bajo.

Metabolismo del carbono en las bacterias nitrificantes

Al igual que los quimiolitotrofos oxidadores del hierro y del azufre, las bacterias nitrificantes aerobias siguen el ciclo de Calvin para la fijación de CO_2 y los requerimientos de ATP y de poder reductor en este proceso suponen una carga adicional para su poco eficiente sistema de producción de energía (el NADH necesario para el ciclo de Calvin se forma por flujo inverso de electrones). Las necesidades energéticas son particularmente estrictas en los oxidadores de nitrito y quizá por esa razón la mayor parte de los oxidadores de nitrito pueden crecer también de forma quimioorganotrófica con glucosa y algunas otras sustancias orgánicas (*véase* Sección 12.3).

Oxidación anóxica de amoníaco: anamox

Aunque, al menos cuando crecen en sustratos nitrogenados reducidos, las bacterias nitrificantes clásicas son *aerobias estrictas*, en condiciones anóxicas también pueden oxidar amoníaco. Este proceso, conocido como **anamox** (de *oxida*ción *an*óxica del *am*oníaco), es altamente exergónico y está

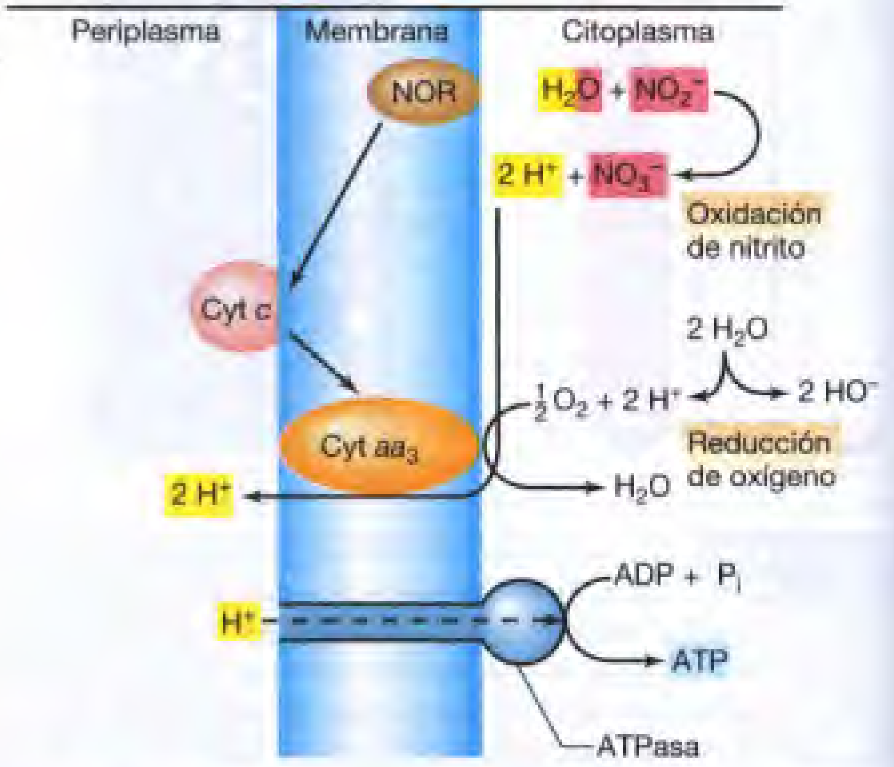
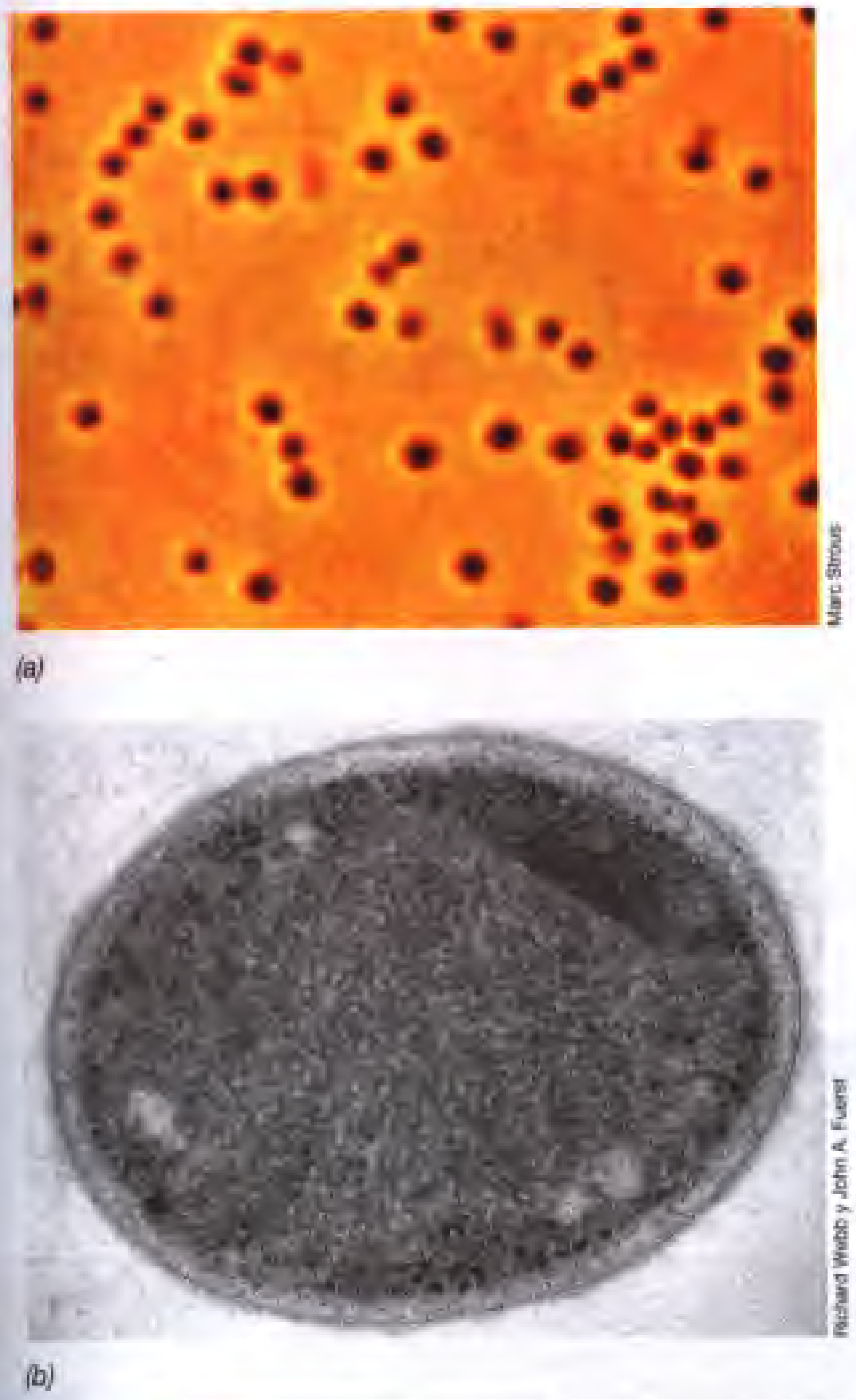


Figura 17.33 Oxidación de nitrito a nitrato por bacterias nitrificantes. Se destacan los reactantes y los productos de esta serie de reacciones. NOR, nitrito oxidorreductasa.

ligado al metabolismo energético de los organismos que lo realizan. La anamox implica la oxidación de amoníaco con nitrito como aceptor de electrones, obteniendo nitrógeno gaseoso:

$$NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2 + 2\,H_2O \qquad \Delta G^{0\prime} = -357\ \text{kJ}$$

El organismo que cataliza la anamox, *Brocadia anammoxidans*, es un miembro claramente separado filogenéticamente que pertenece al filum Planctomycetes del dominio *Bacteria* (*véanse* Sección 12.28 y Figura 17.34). Los Planctomycetes son miembros poco comunes del dominio *Bacteria*, que carecen de peptidoglicano y que contienen compartimentos rodeados por membranas en el interior de la célula, entre los que se encuentra una estructura análoga al núcleo de las células eucariotas (*véase* Sección 12.28). En *B. anammoxidans* el componente principal es el *anamoxosoma*, donde se localiza la reacción anamox (Figura 17.34).



Marc Strous

Richard Webb y John A. Fuerst

Figura 17.34 El organismo anamox, *Brocadia anammoxidans*. (a) Fotomicrografía de contraste de fases. Una célula individual tiene un diámetro aproximado de 1 µm. (b) Micrografía electrónica de transmisión de una célula. Se advierten los compartimentos rodeados por membranas, entre ellos, el gran anamoxosoma fibrilar de la parte central de la célula. *Brocadia* está relacionada filogenéticamente con *Planctomyces*, un organismo que presenta diferentes tipos de compartimentos rodeados por membranas en su citoplasma (*véanse* Sección 12.28 y Figura 12.87).

La fuente de NO_2^- en la reacción descrita es el producto de la oxidación de amoníaco por las bacterias aerobias nitrificantes (Figura 17.32). Los dos grupos de nitrificantes, aerobios (por ejemplo, *Nitrosomonas*) y anaerobios (*Brocadia*), viven juntos en hábitat ricos en amoníaco, como son las aguas residuales y otras de desecho. En estos medios, se encuentran partículas en suspensión que contienen tanto zonas óxicas como anóxicas, donde pueden coexistir ambos grupos de oxidadores de amoníaco. En los cultivos de laboratorio, la abundancia de oxígeno inhibe el amoníaco y favorece la nitrificación clásica. Es probable, por tanto, que en la naturaleza la oxidación de amoníaco debida a la anamox esté regida por la concentración de O_2 en el sistema.

Al igual que las bacterias nitrificantes clásicas, *Brocadia anammoxidans* es también un autotrofo. Este organismo crece con CO_2 como única fuente de carbono y usa nitrito como donador de electrones para producir material celular.

$$CO_2 + 2\,NO_2^- + H_2O \rightarrow CH_2O + 2\,NO_3^-$$

Aunque *B. anammoxidans* es un nitrificador autotrófico, parece que le faltan las enzimas del ciclo de Calvin, y el mecanismo de oxidación de CO_2 no se conoce bien. Sin embargo, el uso de nitrito como donador de electrones para la fijación del CO_2, junto con la producción de nitrato, es exactamente la misma reacción que llevan a cabo los nitrificadores aeróbicos como *Nitrobacter* (*véase* Figura 17.33). De esta forma, aunque filogenéticamente distintos, los nitrificadores aeróbicos y los organismos que realizan la anamox comparten sustratos y ecología.

El descubrimiento de la anamox ha contribuido notablemente a la comprensión del ciclo del nitrógeno. Antes se creía que el amoníaco era estable en medios anóxicos. Ahora, sin embargo, está claro que el amoníaco puede ser oxidado en ausencia de O_2. Desde un punto de vista ambiental, la anamox abre grandes perspectivas en el tratamiento de las aguas residuales anóxicas para eliminar el amoníaco y las aminas, por lo que la investigación en este campo está avanzando para estimular las actividades de la anamox con tal objetivo.

✓ 17.12 Revisión de conceptos

Las bacterias nitrificantes pueden usar amoníaco (NH_3) y nitrito (NO_2^-) como donadores de electrones. Las bacterias oxidadoras de amoníaco producen nitrito, que luego es oxidado por las bacterias oxidadoras de nitrito hasta nitrato (NO_3^-). La oxidación anóxica de NH_3 está acoplada tanto a la producción de N_2 como a la de NO_3^-.

- ✓ ¿Cuál es el donador inorgánico de electrones para *Nitrosomonas*? ¿Y para *Nitrobacter*?
- ✓ ¿Cuáles son los sustratos de la enzima *amoníaco monooxigenasa*?
- ✓ ¿Qué usan las bacterias nitrificantes como fuente de carbono?
- ✓ ¿Qué es la reacción *anamox* y en qué se diferencia de la nitrificación aeróbica?

III EL SISTEMA DE VIDA ANAERÓBICO

El metabolismo anaeróbico es un logro único de los procariotas. En los eucariotas, el crecimiento anaeróbico es raro. Por el contrario, el crecimiento anaeróbico es común en los procariotas y los mecanismos del metabolismo anaeraóbico presentan una elevada diversidad. En las secciones siguientes, se revisará el metabolismo anaeróbico y veremos las numerosas vías por las que los procariotas pueden vivir en ausencia de aire.

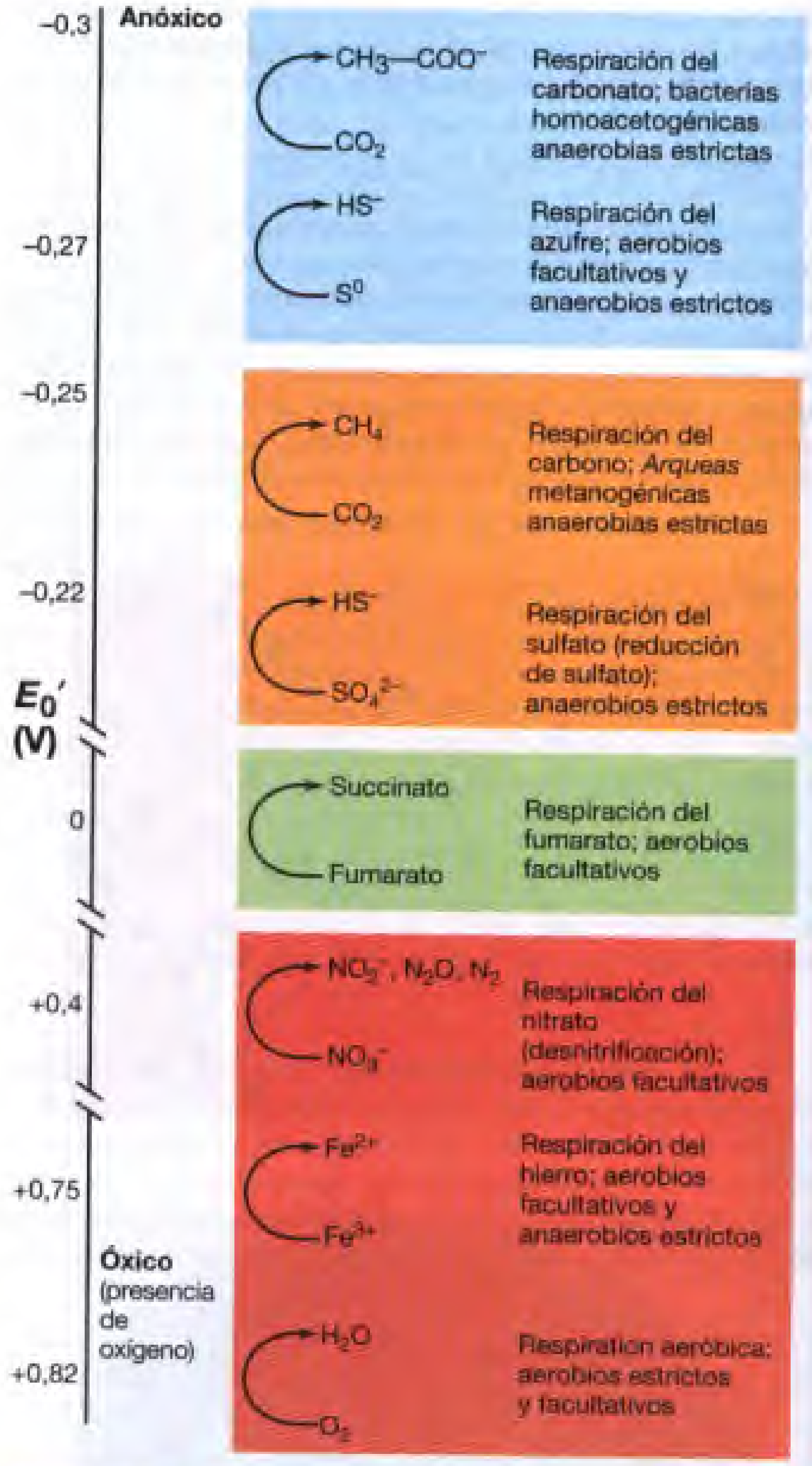
17.13 Respiración anaeróbica

El proceso de respiración *aeróbica* se ha examinado con algún detalle en el Capítulo 5. Como ya se indicó, el oxígeno molecular (O_2) funciona como un aceptor terminal de electrones, recibiendo electrones a través de una cadena de transporte. Sin embargo, ya se indicó que en vez de O_2 se pueden usar otros aceptores de electrones, en cuyo caso el proceso se denomina **respiración anaeraóbica**. Vamos a considerar algunos de estos procesos.

En general, las bacterias que realizan la respiración anaeróbica poseen sistemas de transporte de electrones con citocromos, quinonas, ferrosulfoproteínas y otras proteínas transportadoras de electrones típicas. Por tanto, sus sistemas respiratorios son análogos a los de los aerobios convencionales. En algunos casos, como en el de las bacterias desnitrificantes, el proceso de respiración anaeróbica compite con la respiración aeróbica en el mismo organismo. En tales casos, si está presente el O_2, suele favorecerse la respiración aeróbica, y cuando se agota el O_2 del medio se efectúa la reducción alternativa del otro aceptor. Otros organismos que realizan la respiración anaeróbica son anaerobios *estrictos*, incapaces de usar el O_2.

Aceptores alternativos de electrones y la torre de electrones

La energía liberada por la oxidación de un donador de electrones usando O_2 como aceptor de electrones es mayor que si el mismo compuesto se oxidara con un aceptor de electrones alternativo (*véase* Figura 5.9). Estas diferencias de energía se comprenden si se examinan los potenciales de reducción de cada aceptor (Figura 17.35). Como el par O_2/H_2O es el más electropositivo, se obtendrá más energía con O_2 que con otro aceptor de electrones. Otros aceptores de electrones que están cercanos al O_2 son Fe^{3+}, NO_3^- y NO_2^-. Más lejanos en la escala están S^0, CO_2 y SO_4^{2-}. La Figura 17.35 presenta un resumen de los tipos de respiración anaeróbica más comunes.



−0,3
Anóxico
CH_3—COO^-
CO_2
Respiración del carbonato; bacterias homoacetogénicas anaerobias estrictas
−0,27
HS^-
S^0
Respiración del azufre; aerobios facultativos y anaerobios estrictos
−0,25
CH_4
CO_2
Respiración del carbono; *Arqueas* metanogénicas anaerobias estrictas
−0,22
HS^-
SO_4^{2-}
Respiración del sulfato (reducción de sulfato); anaerobios estrictos
E_0' (V)
0
Succinato
Fumarato
Respiración del fumarato; aerobios facultativos
+0,4
NO_2^-, N_2O, N_2
NO_3^-
Respiración del nitrato (desnitrificación); aerobios facultativos
+0,75
Fe^{2+}
Fe^{3+}
Respiración del hierro; aerobios facultativos y anaerobios estrictos
Óxico (presencia de oxígeno)
+0,82
H_2O
O_2
Respiration aeróbica: aerobios estrictos y facultativos

Figura 17.35 Ejemplos de respiración anaeróbica. Los pares redox aparecen en orden, desde los que tienen valores E_0' más electronegativos (arriba), a aquellos con valor E_0' más electropositivo (abajo).

Metabolismo asimilador y desasimilador

Compuestos inorgánicos tales como NO_3^-, SO_4^{2-} y CO_2 son reducidos por muchos microorganismos como fuentes de nitrógeno, azufre y carbono, respectivamente. Los productos finales de esas reducciones son fundamentalmente grupos amino ($-NH_2$), grupos sulfidrilo ($-SH$) y compuestos carbonados orgánicos, respectivamente. En las Secciones 5.1−5.3 revisamos la *nutrición* de los microorganismos, destacando que todos los organismos necesitan fuentes de N, S y C para su crecimiento. Cuando se reduce un compuesto inorgánico como el NO_3^-, SO_4^{2-} o CO_2 para usarlo como aporte nutricional, se dice que se *asimila* y el proceso de reducción se denomina metabolismo *asimilador*. Cabe resaltar que el metabolismo asimilador de NO_3^-, SO_4^{2-} y CO_2 es muy diferente del uso de estos compuestos como aceptores de electrones en el metabolismo energético. Para distinguir los dos tipos de procesos reductores, la utilización de estos compuestos como aceptores de electrones en el metabolismo energético se denomina metabolismo *desasimilador*.

El metabolismo asimilador y el desasimilador son muy diferentes. En el primer caso, sólo se reducen los compuestos suficientes (NO_3^-, SO_4^{2-} o CO_2) para satisfacer las necesidades nutritivas durante el crecimiento. Los átomos reducidos se convierten finalmente en material celular en forma de macromoléculas. En el metabolismo desasimilador, se reduce una cantidad comparativamente mayor de aceptor de electrones y el producto reducido es *expulsado* al medio. Muchos organismos llevan a cabo un metabolismo asimilador de compuestos como NO_3^-, SO_4^{2-} y CO_2 (por ejemplo, muchas *Bacteria*, *Archaea*, hongos, algas y plantas superiores), mientras que sólo un grupo limitado de organismos, pricipalmente procariotas, realizan metabolismo desasimilador.

✓ 17.13 Revisión de conceptos

Aunque el oxígeno (O_2) es el aceptor de electrones más usado en el metabolismo productor de energía, se pueden usar otros compuestos como aceptores de electrones. Este proceso de respiración anaeróbica es menos eficiente en términos energéticos, pero hace posible que haya respiración en ambientes donde el oxígeno está ausente.

- ✓ ¿Qué es la respiración anaeróbica?
- ✓ Con H_2 como donador de electrones, ¿por qué la reducción de NO_3^- es una reacción más favorable que la reducción de S^0?

17.14 Reducción de nitrato y proceso de desnitrificación

Los compuestos nitrogenados orgánicos son de los más comunes como aceptores de electrones en la respiración anaeróbica. La Tabla 17.12 resume las diversas especies de nitrógeno inorgánico, con sus estados de oxidación. Las formas de nitrógeno inorgánico más comunes en la naturaleza son el amoníaco y el nitrato, que se pueden originar ambas en la atmósfera por procesos químicos inorgánicos, y el gas nitrógeno, N_2, también un gas atmosférico, que es la forma más estable del nitrógeno en la naturaleza. Más adelante, comentaremos la *fijación de nitrógeno*, es decir, la utilización de N_2 como fuente de nitrógeno.

TABLA 17.2 Estados de oxidación de compuestos nitrogenados clave

Compuesto	Estado de oxidación
N orgánico ($R—NH_2$)	−3
Amoníaco (NH_3)	−3
Gas nitrógeno (N_2)	0
Óxido nitroso (N_2O)	+1 (promedio por N)
Óxido de nitrógeno (NO)	+2
Nitrito (NO_2^-)	+3
Dióxido de nitrógeno (NO_2)	+4
Nitrato (NO_3^-)	+5

Uno de los aceptores de electrones alternativos más comunes es el nitrato, NO_3^-, que es reducido a N_2O, NO y N_2. Como estos productos de la reducción del nitrato son todos gaseosos, se pierden con facilidad del medio, por lo que el proceso se denomina **desnitrificación** (Figura 17.36). Este proceso es el modo principal por el que se forma N_2 gaseoso biológicamente, y como el N_2 está mucho menos disponible para los organismos que el nitrato como fuente de nitrógeno, la desnitrificación es perjudicial para la agricultura. Sin embargo, para el tratamiento de aguas residuales es beneficiosa (*véase* Sección 28.3) porque convierte NO_3^- en N_2, disminuyendo significativamente la cantidad de nitrógeno que puede estimular el crecimiento de algas.

Bioquímica de la reduccón desasimiladora del nitrato

La enzima que inicia la reducción desasimiladora del nitrato, la *nitrato reductasa*, es una enzima unida a membrana que contiene molibdeno y cuya síntesis es reprimida por el oxígeno molecular. Todas las enzimas siguientes de la vía (Figura 17.37) están reguladas de manera coordinada y, por tanto, también son reprimidas por el O_2, pero además de en condiciones anóxicas, el nitrato tiene que estar también presente antes de que estas enzimas se hayan expresado totalmente.

El primer producto de la reducción de nitrato es el nitrito (NO_2^-), y la enzima *nitrito reductasa* lo reduce a óxido nítrico (NO) (Figura 17.37*c*). Algunos organismos pueden reducir NO_2^- a amoníaco (NH_3) en un proceso desasimilador, pero es la producción de gases, la *desnitrificación*, la que tiene el mayor significado global. Esto se debe a que consume una forma fijada de nitrógeno (NO_3^-) accesible para las

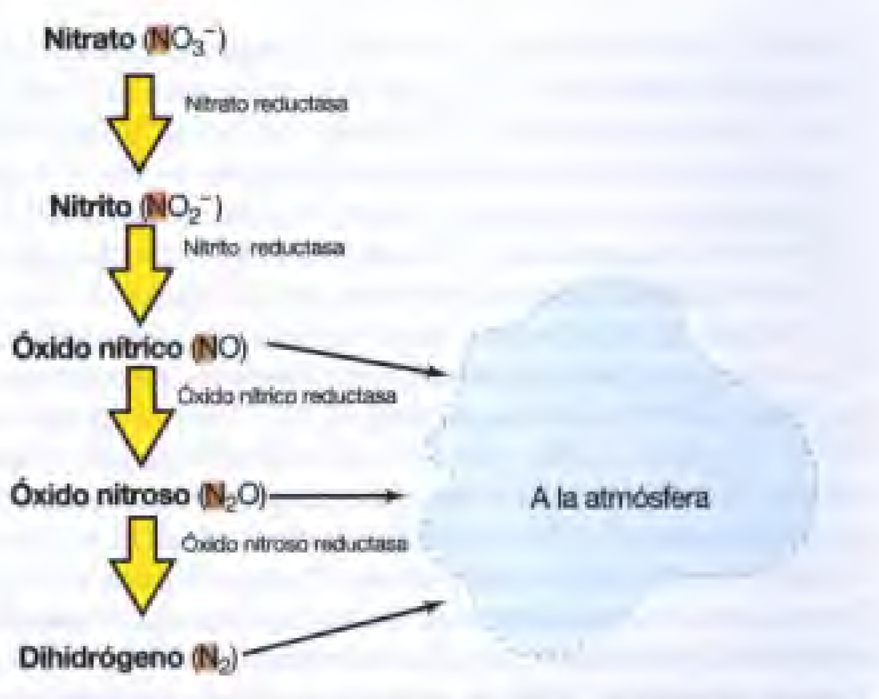


Figura 17.36 Pasos en la reducción desasimiladora de nitrato. Algunos organismos, por ejemplo, *Escherichia coli*, sólo pueden realizar el primer paso. Todas las enzimas que intervienen son desreprimidas por las condiciones anóxicas. También se sabe que algunos procariotas reducen NO_3^- a NH_4^+ en el metabolismo desasimilador.

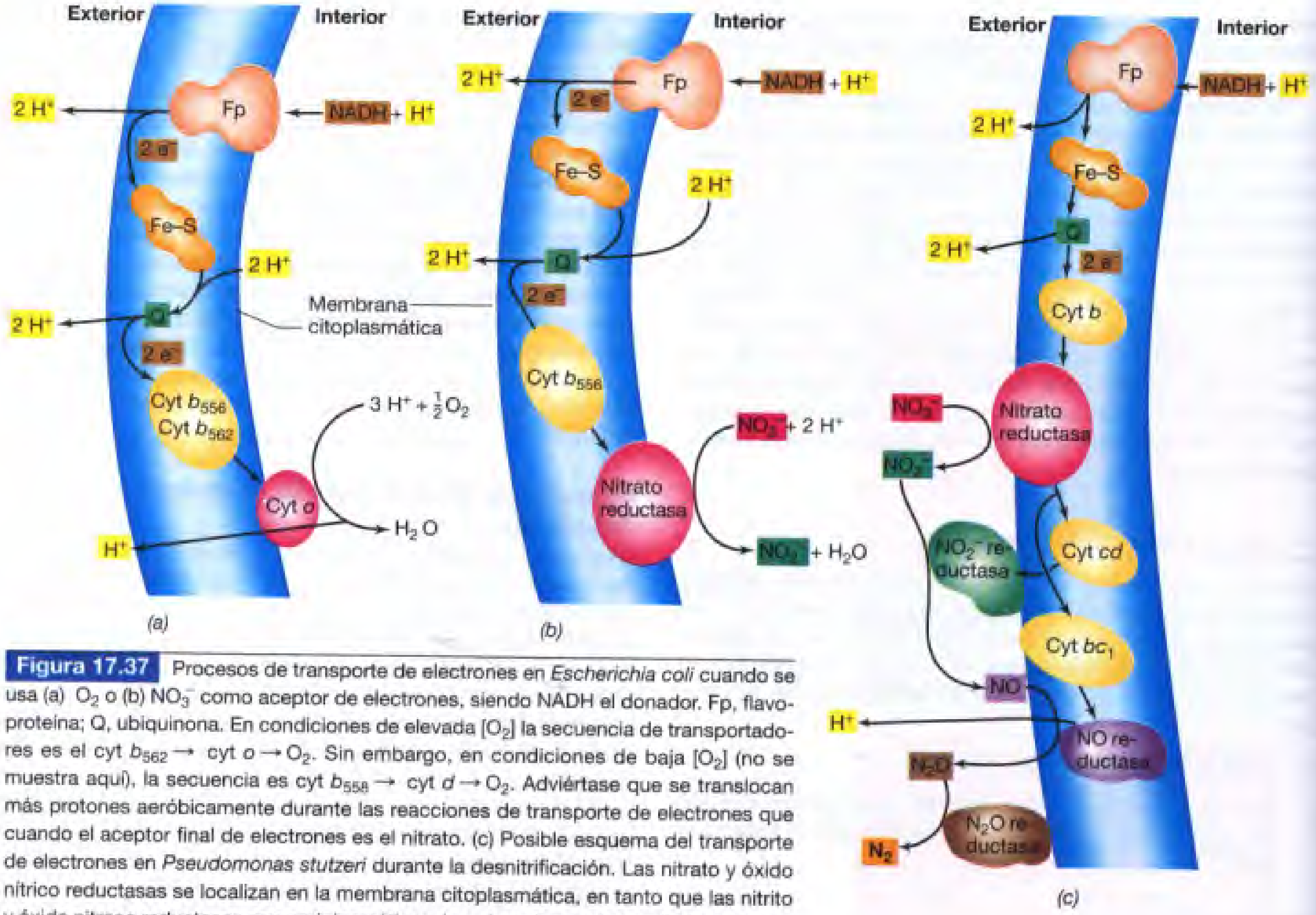


Figura 17.37 Procesos de transporte de electrones en *Escherichia coli* cuando se usa (a) O_2 o (b) NO_3^- como aceptor de electrones, siendo NADH el donador. Fp, flavoproteína; Q, ubiquinona. En condiciones de elevada [O_2] la secuencia de transportadores es el cyt $b_{562} \rightarrow$ cyt $o \rightarrow O_2$. Sin embargo, en condiciones de baja [O_2] (no se muestra aquí), la secuencia es cyt $b_{558} \rightarrow$ cyt $d \rightarrow O_2$. Adviértase que se translocan más protones aeróbicamente durante las reacciones de transporte de electrones que cuando el aceptor final de electrones es el nitrato. (c) Posible esquema del transporte de electrones en *Pseudomonas stutzeri* durante la desnitrificación. Las nitrato y óxido nítrico reductasas se localizan en la membrana citoplasmática, en tanto que las nitrito y óxido nitroso reductasas son periplasmáticas. Los donadores intermediarios de electrones para varias reductasas, con la excepción de la nitrato reductasa, no se han identificado de forma definitiva.

plantas y produce compuestos de nitrógeno gaseoso, algunos de los cuales tienen importancia ambiental. (El N_2O puede convertirse en NO mediante la luz solar, y este último compuesto puede reaccionar con el ozono en la parte superior de la atmósfera dando nitrito, el cual vuelve a la Tierra en forma de lluvia ácida.) Los restantes pasos bioquímicos de la desnitrificación se muestran en la Figura 17.37*c*.

La bioquímica de la reducción desasimiladora de nitratos se ha estudiado en detalle en diversos organismos, entre ellos *Escherichia coli*, donde el NO_3^- es reducido sólo a NO_2^- (Figura 17.37*b*), y en *Paracoccus denitrificans* y *Pseudomonas stutzeri*, donde se produce una auténtica desnitrificación (Figura 17.37*c*). La nitrato reductasa de *E. coli* acepta electrones de un citocromo de tipo *b*; en la Figura 17.37*a* y *b*, se comparan las cadenas de transporte de electrones de la respiración aeróbica y en la anaeróbica en *E. coli*. Como se puede observar, debido al potencial de reducción del par NO_3^-/NO_2^- (+0,43 V), durante la reducción de nitrato sólo tienen lugar dos translocaciones de protones, en vez de las tres que pueden producirse en la respiración aeróbica ($\frac{1}{2}$ O_2/H_2O, +0,82 V). En *P. denitrificans* y *P. stutzeri* se forman óxidos de nitrógeno a partir del nitrito por una serie de enzimas como la *nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa* y *óxido nitroso reductasa*, tal como se resume en la Figura 17.37*c*. Durante el transporte de electrones se establece una fuerza protón motriz, con producción de ATP por la acción de la ATPasa en la forma usual. Cuando el NO_3^- es reducido a N_2 se produce ATP adicional, porque la NO reductasa está ligada a la extrusión de protones (Figura 17.37*c*).

Otras propiedades de los procariotas desnitrificantes

La mayoría de los procariotas desnitrificantes pertenecen filogenéticamente a las proteobacterias (*véanse* Secciones 12.2-12.19) y son aerobios facultativos; la respiración aeróbica se da cuando hay aire, incluso aunque también haya nitrato en el medio. Muchas bacterias desnitrificantes reducen asimismo otros aceptores de electrones de forma anaeróbica, como hierro férrico (Fe^{3+}) y algunos aceptores de electrones orgánicos (*véase* Sección 17.18). Además, muchas crecen por fermentación. De esta forma, las bacterias desnitrificantes son metabólicamente diversas desde el punto de vista de los mecanismos alternativos generadores de energía.

✓ 17.14 Revisión de conceptos

El nitrato es un aceptor de electrones muy común en la respiración anaeróbica. Para su utilización es necesaria la enzima nitrato reductasa, que reduce el nitrato a nitrito. Muchas bacterias que usan nitrato en la respiración anaeróbica producen nitrógeno gaseoso (N_2), un proceso denominado *desnitrificación*.

- ✓ ¿Por qué se libera más energía en la respiración aeróbica que en la desnitrificación?
- ✓ ¿En qué lugar de la célula se encuentra la nitrato reductasa desasimiladora? ¿Qué metal, o metales, contiene?
- ✓ ¿Por qué un organismo como *Pseudomonas stutzeri* obtiene más energía de la respiración de NO_3^- que *Escherichia coli*?

17.15 Reducción de sulfato

Varios compuestos inorgánicos de azufre son aceptores de electrones importantes en la respiración anaeróbica. La Tabla 17.3 resume los estados de oxidación de los compuestos de azufre clave. El sulfato, la forma más oxidada del azufre, es uno de los aniones mayoritarios del agua de mar y lo usan las *bacterias sulfato reductoras*, que constituyen un grupo ampliamente distribuido en la naturaleza. El producto final de la reducción del sulfato es H_2S, un importante compuesto natural que participa en numerosos procesos biogeoquímicos (*véase* Sección 19.13). Tal como ocurre con el nitrógeno, es importante distinguir entre la reducción asimiladora y desasimiladora del sulfato. Muchos organismos, como las plantas superiores, algas, hongos y la mayoría de los procariotas, usan sulfato como fuente de azufre en la biosíntesis. Pero la capacidad de utilizar sulfato como *aceptor de electrones* para procesos que generan energía implica una reducción de SO_4^{2-} a gran escala y está limitada a las bacterias sulfato reductoras. En la reducción asimiladora de sulfato, el H_2S formado se convierte inmediatamente en azufre orgánico en forma de aminoácidos, pero en la desasimiladora el H_2S se excreta.

TABLA 17.3 Compuestos de azufre y donadores de electrones en la reducción del sulfato

Compuestos	Estado de oxidación
Estados de oxidación de compuestos de azufre clave	
S orgánico (R—SH)	−2
Sulfuro (H_2S)	−2
Azufre elemental (S^0)	0
Tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$)	+2 (average per S)
Dióxido de azufre (SO_2)	+4
Sulfito (SO_3^{2-})	+4
Sulfato (SO_4^{2-})	+6
Algunos donadores de electrones usados para la reducción de sulfato	
H_2	Acetato
Lactato	Propionato
Piruvato	Butirato
Etanol y otros alcoholes	Ácidos grasos de cadena larga
Fumarato	Benzoato
Malato	Indol
Colina	Hexadecano

Como muestran los potenciales de reducción de la Tabla A1.2 (Apéndice 1) y la Figura 17.35, el sulfato es un aceptor de electrones menos favorable que el O_2 o que el NO_3^-. Sin embargo, cuando se usa un donador de electrones que produce NADH o FADH, se dispone de suficiente energía para hacer ATP. A causa del rendimiento energético menos favorable, los rendimientos en cuanto a crecimiento son menores para un organismo cuando crece con SO_4^{2-} que cuando crece con O_2 o NO_3^-. En la Tabla 17.3, se incluye una lista de algunos de los donadores de electrones que utilizan las bacterias sulfato reductoras. Los primeros tres compuestos señalados, H_2, lactato y piruvato, los usan muchas bacterias sulfato reductoras; los otros son de uso más limitado. Se conoce una amplia variedad de tipos morfológicos y fisiológicos de bacterias sulfato reductoras (*véase* Sección 12.18).

Bioquímica y rendimiento energético de la reducción de sulfato

La reducción de SO_4^{2-} a H_2S ocurre a través de algunas fases intermedias. El ion sulfato es estable y no puede reducirse si antes no está activado. El sulfato se activa por el ATP. La enzima *ATP sulfurilasa* cataliza la unión del ion sulfato a un fosfato del ATP, dando lugar a la formación de **adenosina fosfosulfato (APS)**, como se indica en la Figura 17.38. En la reducción desasimiladora de sulfato, la parte sulfato de la APS se reduce directamente a sulfito (SO_3^{2-}) por la acción de la enzima *APS reductasa*, con liberación de AMP. En la reducción asimiladora se añade otro P a la APS, formando *fosfoadenosina fosfosulfato (PAPS)* (Figura 17.38*b*), y sólo entonces se reduce la parte sulfato. En ambos casos, el primer producto de la reducción del sulfato es el *sulfito*, SO_3^{2-}. Una vez formado el SO_3^{2-}, se forma sulfuro mediante la enzima *sulfito reductasa* (Figura 17.38*b*).

En la reducción desasimiladora de sulfato, las reacciones de transporte de electrones dan lugar a la formación de una fuerza protón motriz y ésta impulsa la síntesis de ATP por la ATPasa. El portador principal de electrones es el citocromo c_3, que es periplasmático y de bajo potencial (Figura 17.39). El citocromo c_3 acepta electrones de una hidrogenasa localizada en el periplasma (*véase* más adelante) y los transfiere a un complejo proteico asociado a membrana llamado Hmc, que los transporta a través de la membrana citoplasmática. De esta forma, están disponibles para la APS reductasa y la sufato reductasa, que son enzimas citoplasmáticas (Figura 17.39).

La enzima hidrogenasa parece desempeñar un papel central en la reducción del sulfato cuando un organismo como *Desulfovibrio desulfuricans* crece con H_2, *per se*, o con un compuesto orgánico, como el lactato. Los resultados experimentales indican que el lactato se convierte en acetato a través de piruvato, con producción de H_2. [El acetato es excretado porque *D. desulfuricans* es un sulfato reductor que no oxida acetato (*véase* Sección 12.18).] El H_2 producido atraviesa la membrana citoplasmática y es oxidado por la hidrogenasa periplasmática, iniciando una fuerza protón motriz (Figura 17.39). El rendimiento del crecimiento de las

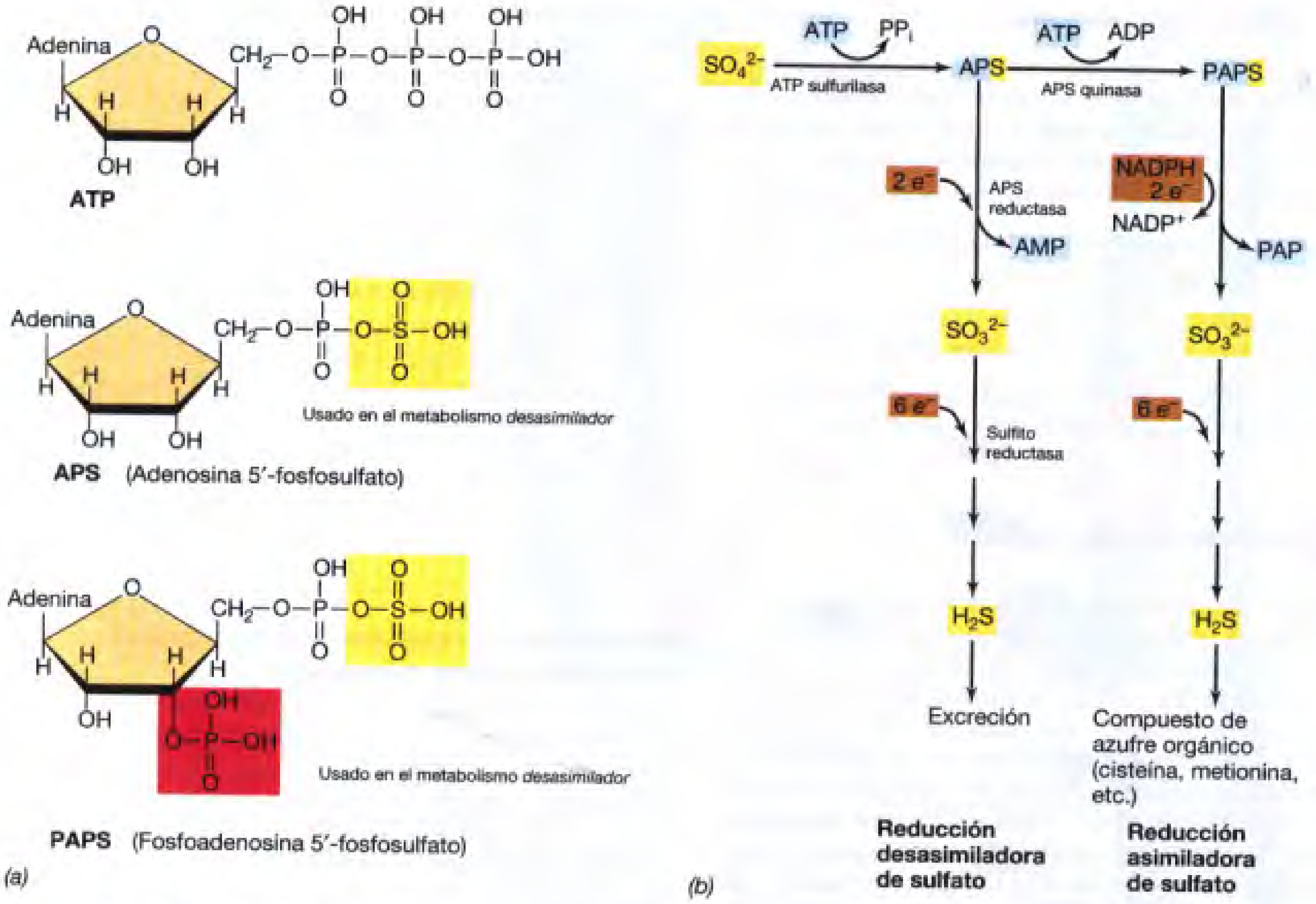

Adenina
ATP
APS (Adenosina 5′-fosfosulfato)
Usado en el metabolismo desasimilador
PAPS (Fosfoadenosina 5′-fosfosulfato)
Usado en el metabolismo desasimilador
(a)
SO₄²⁻
ATP PPᵢ
ATP sulfurilasa
APS
ATP ADP
APS quinasa
PAPS
2 e⁻
APS reductasa
AMP
NADPH 2 e⁻
NADP⁺
PAP
SO₃²⁻
6 e⁻
Sulfito reductasa
H₂S
Excreción
Compuesto de azufre orgánico (cisteína, metionina, etc.)
Reducción desasimiladora de sulfato
Reducción asimiladora de sulfato
(b)

Figura 17.38 Bioquímica de la reducción de sulfato. (a) Pueden producirse dos formas de *sulfato activo*, adenosina 5′-fosfosulfato (APS) y fosfoadenosina 5′-fosfosulfato (PAPS). (b) Esquema de la reducción asimiladora y desasimiladora de sulfato.

bacterias sulfato reductoras indican que por cada SO_4^{2-} reducido a HS^- se produce una molécula de ATP. Con H_2 la reacción es como sigue:

$$4\,H_2 + SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow HS^- + 4\,H_2O \qquad \Delta G^{0\prime} = -152\ \text{kJ}$$

Cuando el lactato o el piruvato es el donador de electrones, no solamente se produce ATP por la fuerza protón motriz, sino también ATP extra durante la oxidación de piruvato a acetato, más CO_2 vía acetil-CoA y acetilfosfato (*véase* Sección 17.19 para más detalles sobre el tema).

Utilización de acetato y autotrofia

Numerosas bacterias sulfato reductoras pueden oxidar completamente acetato a CO_2 como un donador de electrones para la reducción de sulfato (*véase* Sección 12.18):

$$CH_3COO^- + SO_4^{2-} + 3\,H^+ \rightarrow$$
$$2\,CO_2 + H_2S + 2\,H_2O \qquad \Delta G^{0\prime} = -57{,}5\ \text{kJ}$$

Aunque la energética de este proceso no se conoce con la misma precisión que el metabolismo del H_2 o del lactato por *D. desulfuricans*, el mecanismo de la oxidación del acetato es bien conocido. Con pocas excepciones, el acetato es oxidado a CO_2 a través de la vía del acetil-CoA, una serie de reacciones reversibles que usan una amplia variedad de anaerobios para la síntesis o para la oxidación de acetato (*véase* Sección 17.16). Esta vía metabólica usa la enzima clave *monóxido de carbono deshidrogenasa* y fue descubierta en las bacterias homoacetogénicas, que obtienen acetato a partir de $H_2 + CO_2$ como un mecanismo de conservación de energía (*véase* Sección 17.16). Un número reducido de bacterias sulfato reductoras crecen también de forma autotrófica en un medio anóxico de sales minerales que contenga H_2 (como donador de electrones), SO_4^{2-} (como aceptor de electrones) y CO_2 (como fuente de carbono). Cuando crecen en estas condiciones, los sulfato reductores autotróficos usan la vía del acetil-CoA como medio de producción de material celular. *Desulfobacter*, una bacteria sulfato reductora que oxida acetato, carece de las enzimas de la vía del acetil-CoA y oxida acetato a través del ciclo del ácido cítrico, pero esto parece ser la excepción más que la regla.

Reducción desproporcionada de azufre

Algunas bacterias sulfato reductoras llevan a cabo una forma singular de metabolismo llamado *reducción desproporcionada*, usando compuestos de azufre de estado de oxidación intermedio. El término reducción desproporcionada hace referencia a la rotura de un compuesto en dos nuevos, uno de los cuales está más *oxidado* y el otro más *reducido* que el compuesto original. En este apartado vamos a des-

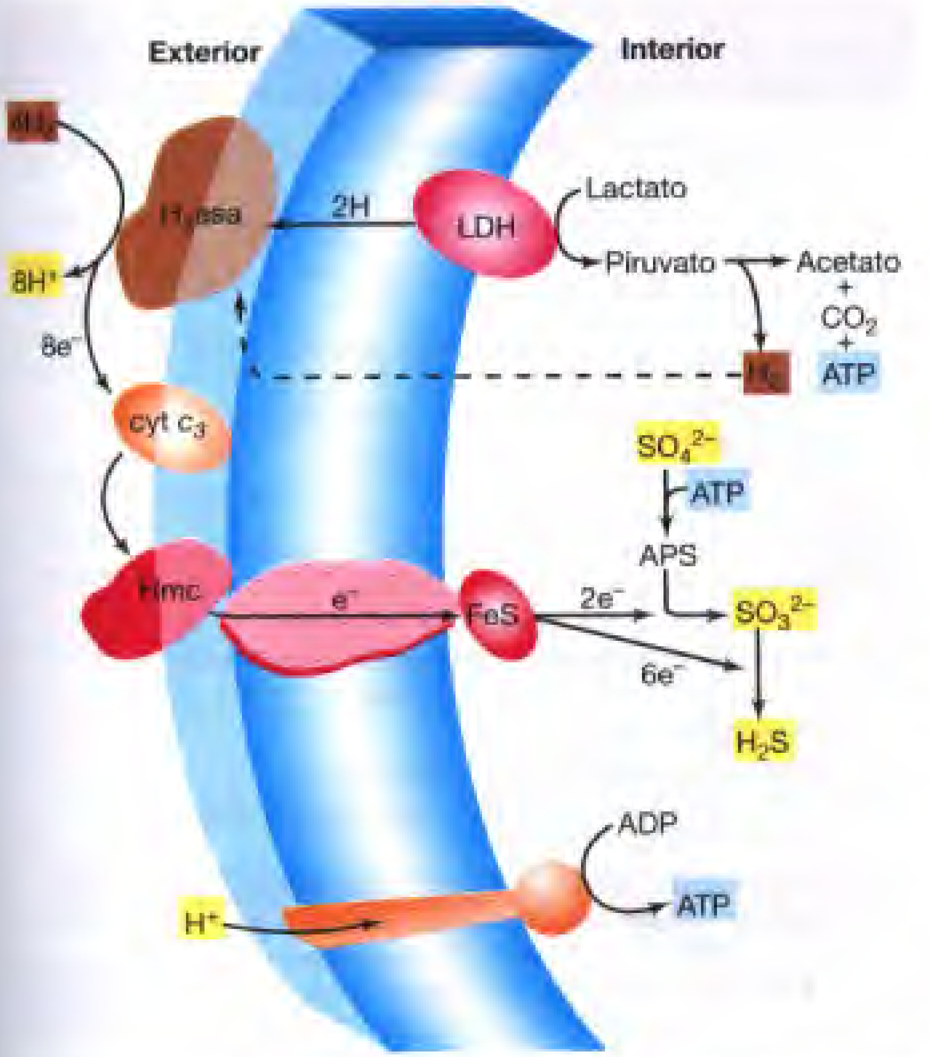


Figura 17.39 Transporte de electrones y conservación de energía en las bacterias sulfato reductoras. Además del hidrógeno externo (H_2), el H_2 procedente del catabolismo de compuestos orgánicos tales como lactato y piruvato pueden activar la hidrogenasa. Las enzimas hidrogenasa, el citocromo c_3 y el complejo de citocromo (Hmc) son proteínas periplasmáticas. Una proteína diferente funciona como lanzadera de electrones a través de la membrana citoplasmática para una ferrosulfoproteína citoplasmática que sumistra electrones a la APS reductasa (formando SO_3^{2-}) y a la sulfito reductasa (formando H_2S).

cribir la reducción desproporcionada del tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$), del sulfito (SO_3^{2-}) y del azufre (S^0).

Desulfovibrio sulfodismutans puede reducir desproporcionadamente compuestos de azufre del siguiente modo:

$$S_2O_3^{2-} + H_2O \rightarrow SO_4^{2-} + H_2S \qquad \Delta G^{0\prime} = -21{,}9 \text{ kJ/reacción}$$

Adviértase que un átomo de azufre del $S_2O_3^{2-}$ se oxida (formando SO_4^{2-}) y el otro se reduce (formando H_2S). La oxidación de tiosulfato por *D. sulfodismutans* impulsa la formación de una fuerza protón motriz que el microorganismos utiliza para fabricar ATP. Otros compuestos reducidos de azufre como el sulfito (SO_3^{2-}) y el azufre (S^0) también pueden resultar desproporcionados por la acción de diversos sulfato reductores. Estas formas de metabolismo puede que sean vías por las cuales las bacterias sulfato reductoras recuperen energía a partir de los intermediarios del azufre producidos por la oxidación de H_2S debida a los quimiolitotrofos del azufre que coexisten con ellos en la naturaleza (*véase* Sección 19.13).

Oxidación de fosfito

Se ha aislado como mínimo una bacteria capaz de acoplar la oxidación de fosfito (HPO_3^-) a la reducción de sulfato. Se trata de una reacción quimioliotrófica y los productos son fosfato y sulfuro:

$$4\,HPO_3^- + SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow 4\,HPO_4^{2-} + HS^- \qquad \Delta G^{0\prime} = -364 \text{ kJ}$$

El organismo implicado, *Desulfotignum phosphitoxidans*, sólo requiere CO_2 para sus necesidades de carbono (se trata, por tanto, de un *autotrofo*) y es un anaerobio estricto. Esto no es sorprendente, ya que el fosfito se oxida espontáneamente en el aire y, por tanto, no es probable que existan oxidadores aeróbicos de fosfito. Aunque no se sabe bien cuál puede ser la fuente de fosfito en la naturaleza, la existencia de un organismo capaz de usar fosfito como única fuente de energía indica que este compuesto es producido en medios anóxicos, quizá a partir de la degradación de fosfatos orgánicos. Junto con la desproporcionación del azufre, la oxidación de fosfito destaca la diversidad metabólica de las bacterias sulfato reductoras con respecto a la quimiolitotrofia, ya que prácticamente todas las especies pueden usar también H_2 como donador de electrones.

✓ 17.15 Revisión de conceptos

Las bacterias sulfato reductoras reducen sulfato a sulfuro de hidrógeno. La reducción de sulfato requiere en primer lugar una activación por ATP para formar el compuesto adenosina fosfosulfato (APS). Los donadores de electrones para la reducción de sulfato son H_2, compuestos orgánicos e incluso fosfito. La reducción desproporcionada de compuestos de azufre es una estrategia para la producción extra de energía por parte de algunos miembros del grupo.

- ✓ Defínanse los siguientes compuestos: S^0, SO_4^{2-}, SO_3^{2-}, $S_2O_3^{2-}$ y H_2S.
- ✓ ¿Cómo se convierte el sulfato en sulfito?
- ✓ ¿Por qué es importante el H_2 para las bacterias sulfato reductoras?
- ✓ ¿Cuál sería un ejemplo de reducción desproporcionada?

17.16 Acetogénesis

El dióxido de carbono, CO_2, es muy común en la naturaleza y suele abundar en los hábitat anóxicos, ya que es uno de los principales productos del metabolismo energético de los quimioorganotrofos. Hay dos grupos de procariotas anaerobios estrictos que usan CO_2 como aceptor de electrones en el metabolismo energético: los *homoacetógenos* y los *metanógenos*. El hidrógeno (H_2) es un donador importante para ambos tipos de microorganismos. La Figura 17.40 presenta un resumen de los procesos metanogénicos y acetogénicos. Ambos generan gradientes de iones, ya sean de H^+ o Na^+, que impulsan las ATPasas de la membrana, pero la acetogénesis también implica conservación de energía mediante la fosforilación a nivel de sustrato. En esta sección, nos centraremos en la acetogénesis y en la siguiente en la metanogénesis.

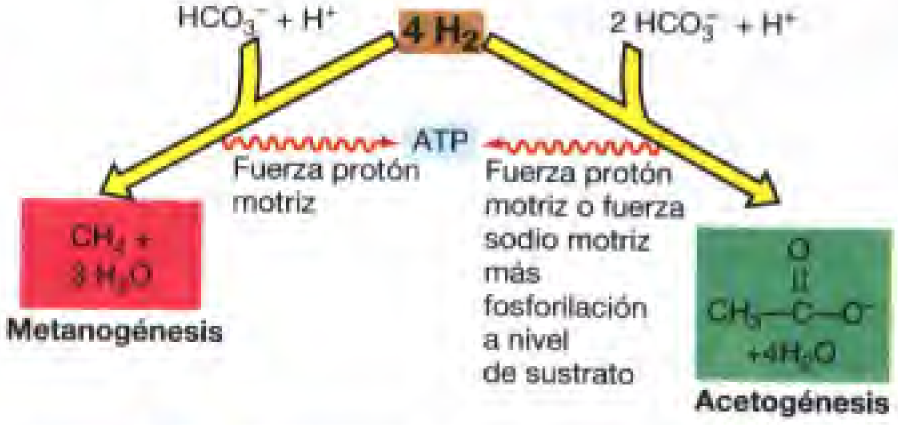


Figura 17.40 Comparación del proceso de la metanogénesis y la acetogénesis. La energía libre ($\Delta G^{0\prime}$) liberada en cada reacción es: en la metanogénesis, −136 kJ, y en la acetogénesis, −105 kJ.

Microorganismos y vías metabólicas

Los organismos homoacetógenos pueden llevar a cabo la siguiente reacción:

$$4\ H_2 + H^+ + 2\ HCO_3^- \rightarrow CH_3COO^2 + 4\ H_2O$$

Además de H_2, los donadores de electrones para la acetogénesis incluyen una variedad de compuestos C_1, azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos, alcoholes y algunas bases nitrogenadas, dependiendo del organismo. Muchos homoacetógenos reducen también NO_3^- y $S_2O_3^{2-}$, pero es probablemente la reducción de CO_2 la principal reacción con significado ecológico.

La característica común más importante de los homoacetógenos es la vía metabólica de la reducción de CO_2. Los homoacetógenos convierten el CO_2 en acetato por la *vía del acetil-CoA* (véase más adelante), y en muchos homoacetógenos autotróficos hay también crecimiento por esta vía. La vía del acetil-CoA se conoce también como *vía de Ljungdahl-Wood*, en honor de sus descubridores, Lars Ljungdahl y Harland Wood. En la Tabla 17.4, aparecen los principales organismos que producen u oxidan acetato por la vía del acetil-CoA. Microorganismos como *Acetobacterium woodii* y *Clostridium aceticum* pueden crecer bien de forma quimioorganotrófica por fermentación de azúcares (reacción 1), o bien quimiolitotrófica a través de la reducción del CO_2 a acetato con H_2 (reacción 2) como donador de electrones; en cualquiera de los dos casos, el principal producto es el acetato:

(1) $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3\ CH_3COO^- + 3\ H^+$

(2) $2\ HCO_3^- + 4\ H_2 + H^+ \rightarrow CH_3COO^- + 4\ H_2O$

Los microorganismos homoacetógenos fermentan la glucosa por la vía glicolítica, que convierte la glucosa en dos moléculas de piruvato y dos moléculas de NADH (el equivalente a 4 H). A partir de aquí, se obtienen dos moléculas de acetato:

(3) $2\ \text{piruvato}^- \rightarrow 2\ \text{acetato}^- + 2\ CO_2 + 4\ H^+$

El tercer acetato de la fermentación del homoacetato proviene de la reducción de dos moléculas de CO_2 generadas en la reacción (3), usando los cuatro electrones obtenidos de la glicólisis *más* los cuatro electrones producidos en la reacción de los dos piruvatos a dos acetatos [reacción (3)].

TABLA 17.4 Organismos que utilizan la vía del acetil-CoA de fijación de CO_2

I. Síntesis de acetato como resultado del metabolismo energético
- *Acetoanaerobium noterae*
- *Acetobacterium woodii*
- *Acetobacterium wieringae*
- *Acetogenium kivui*
- *Acetitomaculum ruminis*
- *Clostridium aceticum*
- *Clostridium thermoaceticum*
- *Clostridium formicoaceticum*
- *Desulfotomaculum orientis*
- *Sporomusa paucivorans*
- *Eubacterium limosum* (también produce butirato)
- *Treponema* sp. cepass ZAS-1 y ZAS-2 (espiroquetas del intestino de los termes)

II. Síntesis de acetato en el metabolismo autotrófico
- Bacterias homoacetogénicas autotrofas
- Metanógenos autotrofos
- Bacterias autotrofas sulfato reductoras

III. Oxidación de acetato en el metabolismo energético
- *Reacción*: acetato + 2 $H_2O \rightarrow 2\ CO_2 + 8$ H
  - Grupo II de sulfato reductores (distintos a *Desulfobacter*)
- *Reacción*: acetato $\rightarrow CO_2 + CH_4$
  - Metanógenos acetotróficos (*Methanosarcina, Methanosaeta*)

Iniciando la reacción con el piruvato, la producción global de acetato puede escribirse como sigue:

$$2\text{-piruvato}^- + 4\ H \rightarrow 3\text{-acetato}^- + H^+$$

La mayoría de bacterias homoacetógenas que producen y excretan acetato en el metabolismo energético son Gram positivas, y muchas aparecen clasificadas en el género *Clostridium*. Un número reducido de Gram positivas y muchas bacterias Gram negativas diferentes usan la vía del acetil-CoA para la autotrofia, reduciendo CO_2 a acetato para tener carbono celular. La vía del acetil-CoA funciona en el crecimiento autotrófico en algunas bacterias sulfato reductoras (*véanse* Secciones 12.18 y 19.13), y también la usan los metanógenos, la mayoría de los cuales crecen de forma autotrófica con $H_2 + CO_2$ (*véanse* Secciones 13.4, 17.17 y 19.10). Por el contrario, algunas bacterias emplean principalmente las reacciones de la vía del acetil-CoA en la dirección *inversa*, con el fin de oxidar acetato a CO_2. Entre estos organismos están los metanógenos acetotróficos (*véase* Sección 13.4) y las bacterias sulfato reductoras (*véase* Sección 12.18).

Reacciones de la vía del acetil-CoA

A diferencia de otras vías autotróficas como la del ciclo de Calvin (*véase* Sección 17.6), o la del ciclo inverso del ácido cítrico (*véase* Sección 17.7), la vía del acetil-CoA de fijación de CO_2 *no* es un ciclo. En su lugar, lleva a cabo una reducción del CO_2 mediante dos vías lineales —una molécula de CO_2 es reducida al grupo metilo del acetato, y la otra es reducida al grupo carbonilo— seguidas por su ensamblaje final para formar acetil-CoA (Figura 17.41). Una enzima clave en la vía del acetil-CoA es la *monóxido de carbono*

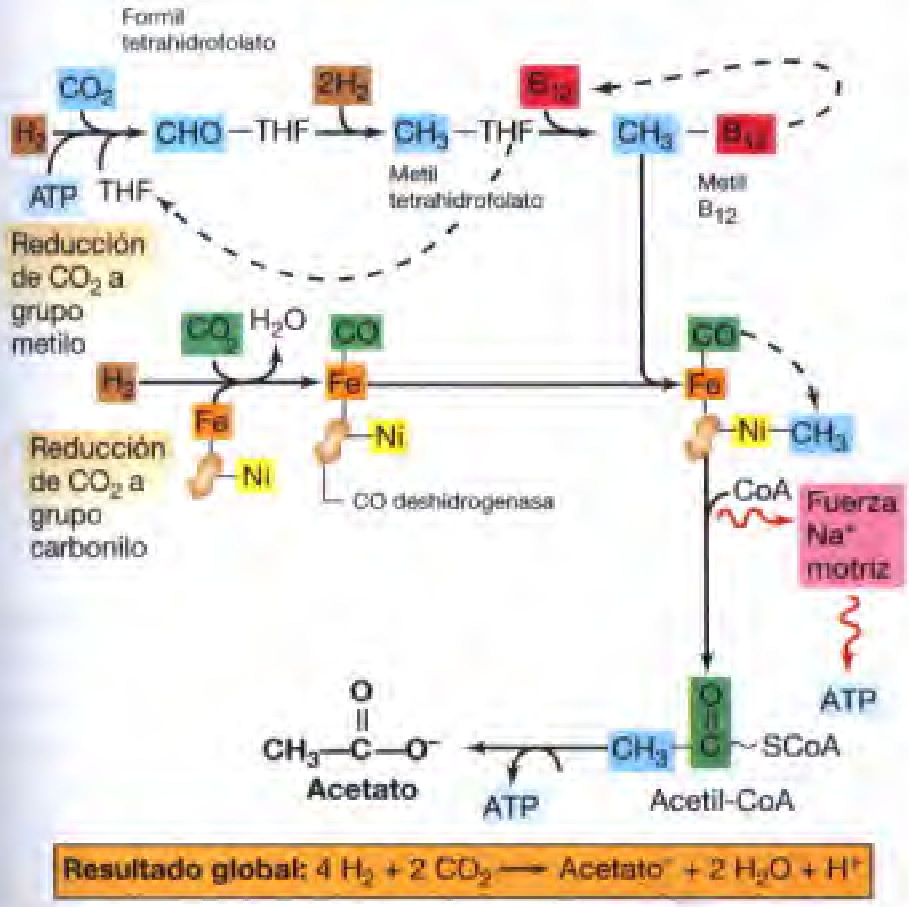


Figura 17.41 Reacciones de la vía del acetil-CoA. THF, tetrahidrofolato; B_{12}, vitamina B_{12} en un intermediario ligado a la enzima. El CO está unido a un átomo de Fe en la CO deshidrogenasa, y el grupo CH_3 a un átomo de níquel de un compuesto de níquel orgánico en la CO deshidrogenasa. Obsérvese cómo la formación de acetato impulsa una bomba de Na^+ que se usa para la síntesis de ATP, y que ésta también se produce durante la conversión de acetil-CoA a acetato.

(CO) *deshidrogenasa*. La CO deshidrogenasa es una enzima compleja que contiene los metales Ni, Zn y Fe como cofactores metálicos. La CO deshidrogenasa cataliza la siguiente reacción:

$$CO_2 + H_2 \rightarrow CO + H_2O$$

y el CO obtenido acaba en la posición *carbonilo* ($—COO^-$) del acetato (Figura 17. 41). El grupo metilo del acetato se origina a partir de la reducción de CO_2 por una serie de reacciones en las que interviene la coenzima *tetrahidrofolato* (Figura 17.41). El grupo metilo formado se transfiere desde el tetrahidrofolato a una enzima que contiene vitamina B_{12} como cofactor (Figura 17.41). En el paso final de la vía, el grupo CH_3 se combina con CO en la CO deshidrogenasa dando acetato. Es curioso que en el mecanismo de reacción interviene el grupo CH_3. Éste se encuentra unido a un átomo de níquel en la enzima, combinándose con CO, el cual está unido a un átomo de Fe también en la enzima, y con la coenzima A, formando el producto final, acetil-CoA. La trascendencia de todo ello reside en el hecho de que este mecanismo fue la primera reacción alquilo-níquel descubierta en bioquímica.

Debido a que los homoacetógenos pueden crecer a expensas de las reacciones del acetil-CoA, esta secuencia de reacciones debe ser en conjunto conservador de energía (Figura 17.41). Un punto de síntesis de ATP es durante la conversión de acetil-CoA a acetato más ATP (vía acetil-P) (Sección 17.19). Sin embargo, existen otros pasos de conservación de energía adicionales porque se establece un gradiente de Na^+ (fuerza sodio motriz, análogo a una fuerza protón motriz, pero con Na^+ en lugar de H^+) a través de la membrana citoplasmática durante la acetogénesis. Este estado energetizado de la membrana permite la conservación de energía mediante la acción de una ATPasa impulsada por una bomba de Na^+. Una situación similar ocurre con el fermentador de succinato *Propionigenium*, cuya conservación de energía a partir de gradientes Na^+ se discute en la Sección 17.20.

✓ 17.16 Revisión de conceptos

Los homoacetógenos son anaerobios que reducen CO_2 a acetato, generalmente con H_2 como donador de electrones. El mecanismo de formación del acetato es la vía del acetil-CoA, una serie de reacciones ampliamente distribuidas entre los anaerobios estrictos, tanto como mecanismo de autotrofia como para el catabolismo del acetato.

- ✓ Dibújese la estructura del acetato identificando el grupo carbonilo y el grupo metilo. ¿Qué enzima clave de la vía del acetil-CoA produce el grupo *carbonilo* del acetato?
- ✓ ¿Cómo fabrican ATP los homoacetógenos a partir de la síntesis de acetato?
- ✓ Si el catabolismo de la fructosa vía glicólisis produce sólo *dos* moléculas de acetato, ¿cómo puede *Clostridium aceticum* fermentar la fructosa por esta vía y producir *tres* moléculas de acetato?

17.17 Metanogénesis

La producción biológica de metano la lleva a cabo un grupo de arqueas anaerobias estrictas que reciben el nombre de *metanógenos*. En la Sección 13.4, se consideraron sus propiedades básicas y su taxonomía; en ésta se trata la bioquímica y bioenergética de estos microorganismos. Los estudios sobre metanogénesis han revelado que la producción biológica de metano tiene lugar a través de una serie exclusiva de reacciones en las que intervienen coenzimas especiales y que tienen una complejidad sorprendente. Vamos a tratar en primer lugar las coenzimas, por la gran importancia que tienen en las reacciones que describiremos y en la producción de metano a partir de $H_2 + CO_2$.

Portadores de C_1 en la metanogénesis

Las coenzimas exclusivas de la metanogénesis pueden dividirse en dos clases: las que transportan la unidad C_1 desde el sustrato inicial, el CO_2, hasta el producto final, CH_4, y las que en la reacción redox suministran los electrones necesarios para la reducción de CO_2 a CH_4 (Figura 17.42, *véase* también Figura 17.44).

La coenzima **metanofurano** interviene en el primer paso de la metanogénesis. Contiene el anillo furanósico de cinco miembros y un átomo de nitrógeno amínico que se une al CO_2 (Figura 17.42*a*). La **metanopterina** (Figura 17.42*b*) es

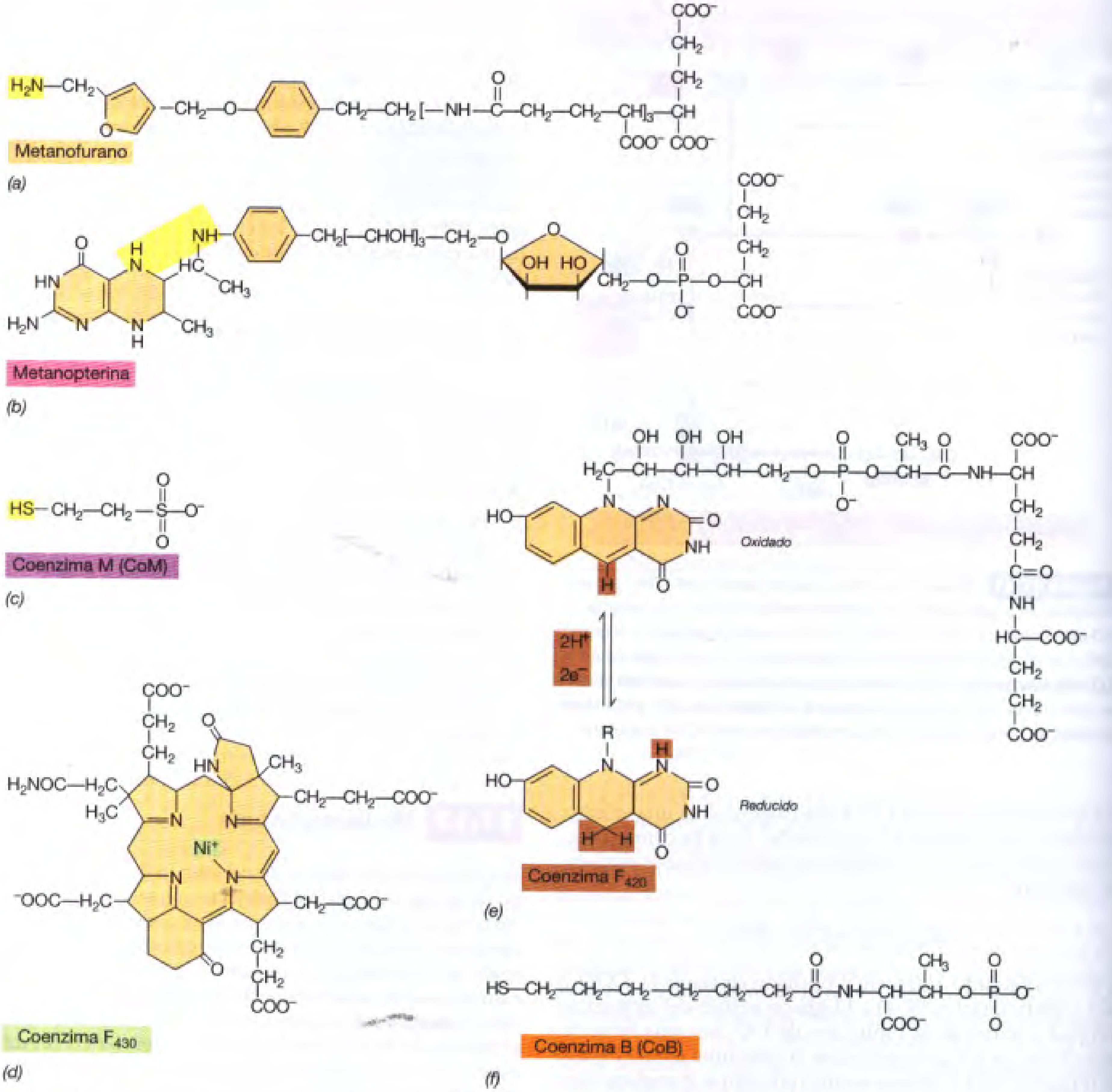


Figura 17.42 Coenzimas exclusivas de las *Archaea* metanogénicas. Los átomos que aparecen sombreados en marrón o amarillo son los sitios de las reacciones oxidación reducción (F_{420}-marrón) o la posición a la cual la mitad C1 se adhiere durante la reducción de CO_2 a CH_4 (metanofurano, metanopterina y coenzima M-amarillo). Se han usado colores para destacar una coenzima determinada (por ejemplo, anaranjado para CoB), que son los mismos en las Figuras 17.44 a 17.46 y se pueden usar para seguir las reacciones en cada figura.

una coenzima metanogénica parecida a la vitamina ácido fólico (*véase* Figura 20.16*c*) y es la portadora de C_1 en los pasos intermedios de la reducción de CO_2 a CH_4. La **coenzima M (CoM)** (Figura 17.42*c*) es una pequeña molécula que interviene en el paso final de la metanogénesis, la conversión de un grupo metilo (CH_3) en CH_4. Aunque no es un portador de C_1, la **coenzima F_{430}**, un tetrapirrol que contiene níquel (Figura 17.42*d*), interviene también en el paso final de la metanogénesis como parte del complejo enzimático metilreductasa (*véase* más adelante).

Coenzimas redox

Las coenzimas **F_{420}** y el **7-mercaptoheptanoil-treonina fosfato, o coenzima B (CoB),** son donadores de electrones en la metanogénesis. La coenzima F_{420} (Figura 17.42*e*) es un derivado de la flavina, de estructura parecida a la coenzima

FMN (*véase* Figura 5.15). Tiene también una función en la metanogénesis como donador de electrones en varios pasos de la reducción de CO_2 (*véase* Figura 17.44). La forma oxidada de F_{420} absorbe luz a 420 nm y presenta fluorescencia verdeazulada (Figura 17.43), que resulta útil en microscopía para identificar un microorganismo como metanógeno. La CoB interviene en el paso final de la metanogénesis, catalizado por el **complejo enzimático metil reductasa**. Como se muestra en la Figura 17.42*f*, la estructura de CoB es bastante sencilla y se parece a la vitamina ácido pantoténico (que es parte del acetil-CoA) (*véase* Figura 5.12). Tras esta primera visión de las coenzimas de la metanogénesis, pasemos ahora a las reacciones implicadas en la reducción de CO_2 a CH_4.

Bioquímica de la reducción de CO_2 a CH_4

Por lo general, la reducción de CO_2 a CH_4 depende de H_2, pero el formiato, el monóxido de carbono e incluso algunos compuestos orgánicos como los alcoholes pueden suministrar los electrones necesarios para la reducción de CO_2. Por ejemplo, el 2-propanol puede ser oxidado a acetona, produciendo electrones para la metanogénesis en algunas especies. Pero, en general, la producción de CH_4 a partir de CO_2 está impulsada por el hidrógeno molecular (H_2).

Los pasos en la reducción del CO_2 que se muestran en la Figura 17.44, se resumen así:

1. El CO_2 es activado por la enzima que contiene metanofurano y posteriormente es reducido al nivel de formilo.
2. El grupo formilo se transfiere del metanofurano a una enzima que contiene metanopterina (MP en la Figura 17.44) y posteriormente es deshidratado y reducido en dos pasos distintos a los niveles de metileno y metilo.
3. El grupo metilo se transfiere de la metanopterina a una enzima que contiene CoM.
4. El metil-CoM es reducido a metano por el sistema de la metilreductasa, en el cual la F_{430} y la CoB están totalmente implicadas. La coenzima F_{430} elimina el grupo CH_3 del CH_3-CoM, formando un complejo Ni^{2+}-CH_3. Éste es reducido por los electrones del CoB y un complejo disulfuro de CoM y CoB (CoM-S—S-CoB). Las CoM y CoB libres son regeneradas por reducción de este complejo con H_2, según se verá más adelante. Esta reacción es la que permite la conservación de la energía en la metanogénesis.

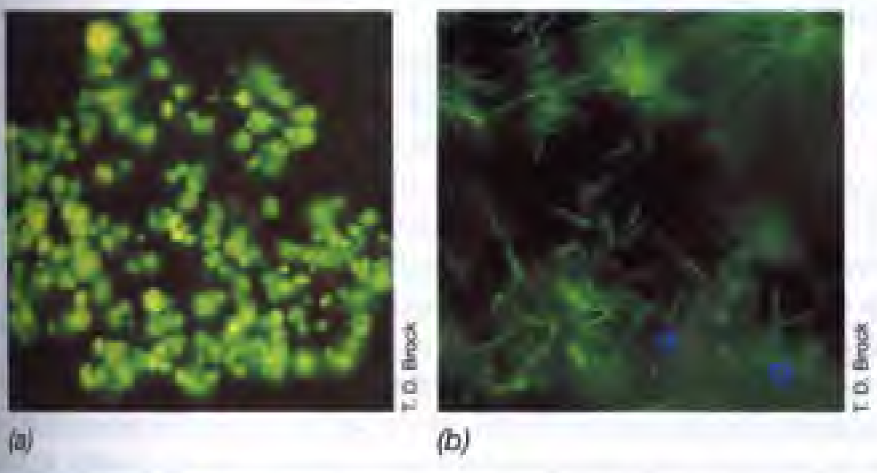


Figura 17.43 (a) Autofluorescencia en células del metanógeno *Methanosarcina barkeri* debido a la presencia del portador exclusivo de electrones F_{420}. Cada una de estas células mide aproximadamente 1,7 µm de diámetro. Los organismos son visibles con luz azul en microscopio de fluorescencia (*véanse* Sección 4.1 y Figura 4.6). (b) Fluorescencia F_{420} en células del metanógeno *Methanobacterium formicicum*. El diámetro de la célula es de 0,6 µm.

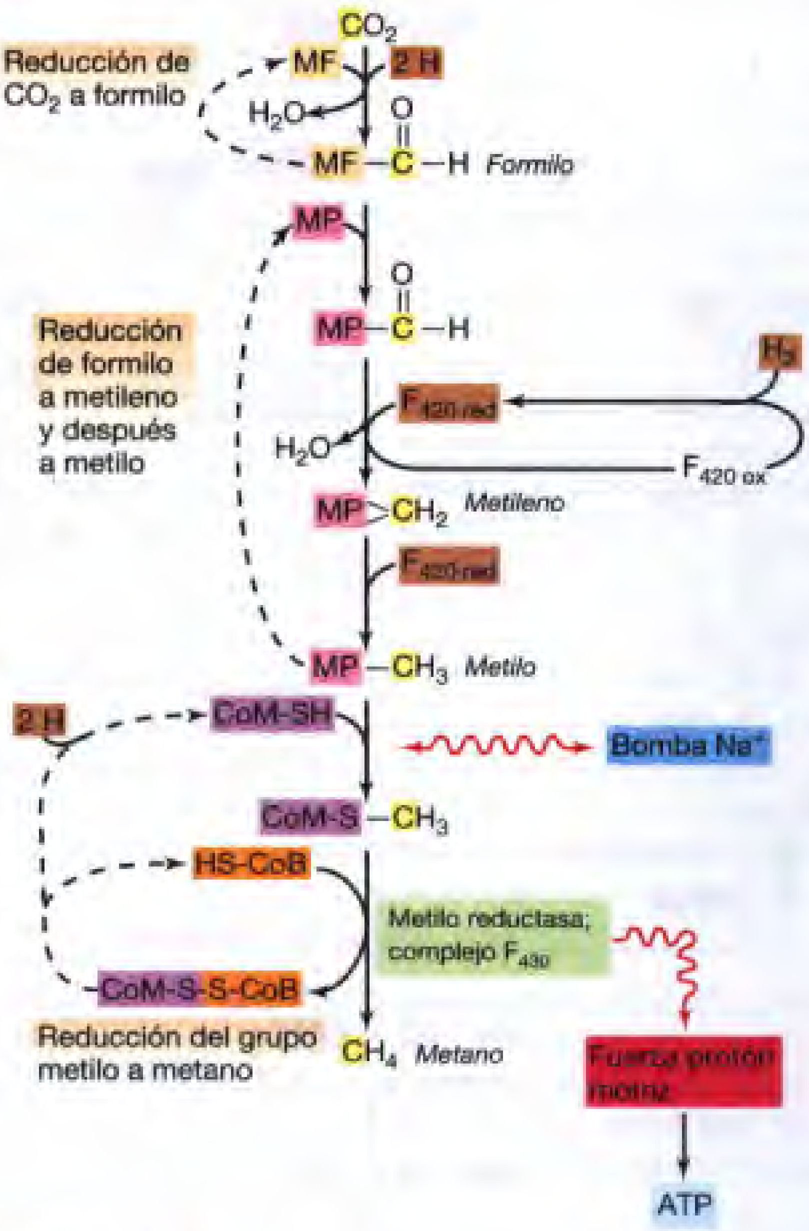
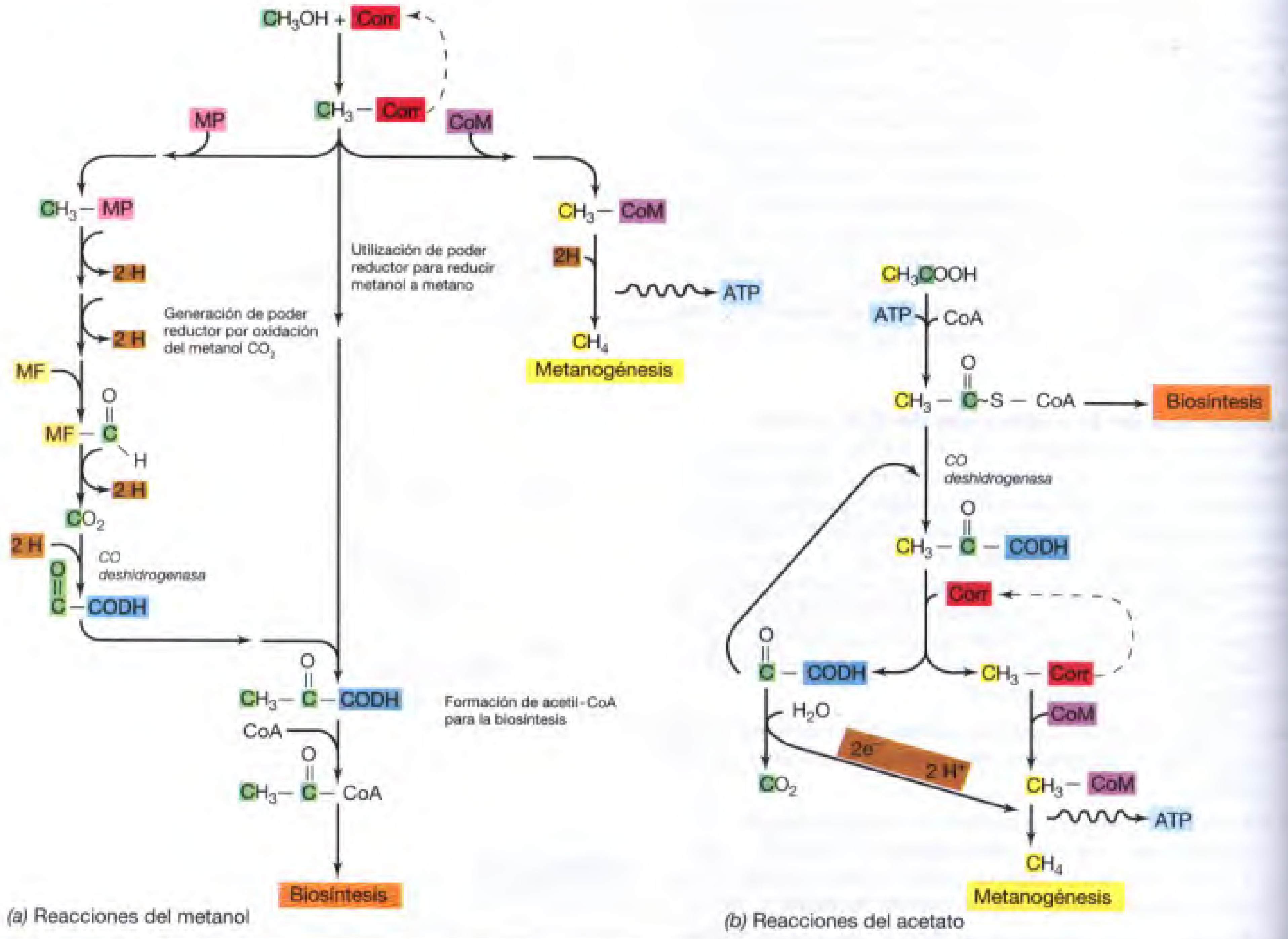


Figura 17.44 Vía de la metanogénesis a partir de CO_2. MF, metanofurano; MP, metanopterina; CoM, coenzima M; F_{420red}, coenzima F_{420} reducida; F_{430}, coenzima F_{430} y CoB, coenzima B. El átomo de carbono reducido se muestra en color amarillo y la fuente de electrones aparece destacada en marrón. *Véase* Figura 17.42 para las estructuras de las coenzimas y el texto para una discusión de la bomba de Na^+ reversible. Se desconoce cuál es el donador de electrones inmediato en el primer paso de la metanogénesis. Los electrones para la reducción de CO_2 proceden generalmente del H_2, pero en ciertos metanógenos algunos compuestos orgánicos pueden ser oxidados, produciendo electrones para la reducción de CO_2.

Metanogénesis a partir de compuestos metilados y acetato

Vimos en la Sección 13.4 que, además de $H_2 + CO_2$, puede formarse metano a partir de diversos compuestos metilados. Estos compuestos, como el metanol, son catabolizados pasando grupos metilo a una proteína corrinoide, formando CH_3-corrinoide (Figura 17.45). Los corrinoides son las


CH_3OH + Corr
CH_3 – Corr
MP
CoM
CH_3 – MP
2 H
2 H
Generación de poder reductor por oxidación del metanol CO_2
Utilización de poder reductor para reducir metanol a metano
CH_3 – CoM
2H
ATP
CH_4
Metanogénesis
MF
MF – C – H
O
2 H
CO_2
2 H
CO deshidrogenasa
C – CODH
CH_3 – C – CODH
Formación de acetil-CoA para la biosíntesis
CoA
CH_3 – C – CoA
Biosíntesis
CH_3COOH
ATP
CoA
CH_3 – C ~ S – CoA
Biosíntesis
CO deshidrogenasa
CH_3 – C – CODH
Corr
C – CODH
CH_3 – Corr
H_2O
CoM
$2e^-$
$2 H^+$
CO_2
CH_3 – CoM
ATP
CH_4
Metanogénesis

(a) Reacciones del metanol

(b) Reacciones del acetato

Figura 17.45 Utilización de las reacciones de la vía del acetil-CoA durante el crecimiento en metanol (a), o acetato (b), por las arqueas metanogénicas. Para el crecimiento en metanol, la mayoría del carbono del metanol se convierte en CH_4, en tanto que una pequeña cantidad se convierte o bien en CO_2 o bien, mediante la formación de acetil-CoA, es asimilado como material celular. Las abreviaturas y el código de colores son los mismos que en las Figuras 17.42 y 17.44. Corr, proteína que contiene corrinoide.

estructuras predecesoras inmediatas de compuestos tales como la vitamina B_{12} y contienen un anillo de corrina, del tipo de las porfirinas, con un átomo central de cobalto (*véase* Figura 30.12). El complejo CH_3-corrinoide cede el grupo metilo a la CoM, dando CH_3-CoM; a partir de éste, se forma metano de la misma manera que en el paso final de la reducción de CO_2 que se acaba de describir (compárense Figuras 17.44 y 17.45*a*). Si no se dispone de poder reductor (tal como H_2) para impulsar el paso terminal, algo de metanol debe ser oxidado a CO_2 para producir electrones. Esto se hace por la inversión de los pasos de la metanogénesis (Figura 17.45*a*).

Cuando el sustrato de la metanogénesis es el *acetato*, éste es activado a acetil-CoA, que puede interaccionar con la monóxido de carbono deshidrogenasa de la vía del acetil-CoA (*véase* Sección 17.16). Entonces, el grupo metilo del acetato se transfiere a la enzima corrinoide produciéndo CH_3-corrinoide, y desde allí cambia al paso terminal de la metanogénesis, en el que interviene la CoM (Figura 17.45*b*).

Autotrofia

La autotrofia en los metanógenos se da a través de las reacciones de la vía del acetil-CoA discutida en la Sección 17.16. Como hemos visto, partes de esta vía están ya integradas en el catabolismo del metanol y el acetato (Figura 17.45). Sin embargo, los metanógenos carecen de la serie de reacciones dirigidas por el tetrahidrofolato de la vía del acetil-CoA que conducen a la producción de un grupo metilo (Figura 17.41). En todo caso, esas reacciones son innecesarias ya que los metanógenos obtienen sus grupos metilo directamente de sus donadores de electrones (Figura 17.45), o los fabrican durante la metanogénesis a partir de H_2 + CO_2 (Figura 17.44); de esta forma, la célula dispone de grupos metilo en abundancia para empezar el proceso. El grupo carbonilo del acetato obtenido durante el crecimiento autotrófico de los metanógenos procede de la CO deshidrogenasa, y la fase final de la síntesis de acetato tiene lugar de la misma forma descrita para los homoacetógenos (*véase* Sección 17.6 y Figura 17.41).

Conservación de energía en la metanogénesis

En condiciones estándar, el cambio de energía libre en la reducción de CO_2 a CH_4 con H_2 es −131 kJ/mol. Esto es suficiente para la síntesis de, al menos, una molécula de ATP. Se ha mencionado que la conservación de energía en la metanogénesis está ligada al paso final, el de la *metilreductasa* (Figura 17.44). La interacción de CoB con CH_3—CoM en este paso final forma CH_4 y un heterodisulfuro, CoM-S—S-CoB. Este último complejo es reducido con los electrones que proporciona F_{420}, produciendo CoM-SH y CoB-SH (Figura 17.44). Esta reducción, realizada por la enzima *heterodisulfuro reductasa*, es exergónica y está asociada a la extrusión de protones a través de la membrana, que crea una fuerza protón motriz (Figura 17.46). La disipación del gradiente de protones por una ATPasa translocadora de protones (las ATPasas se tratan en la Sección 5.12) origina la síntesis de ATP durante la metanogénesis, del mismo modo que ocurre en otras formas de respiración. En el flujo de electrones hacia la heterodisulfuro reductasa participa un portador de electrones exclusivo integrado en la membrana, un compuesto de fenazina denominado *metanofenazina* (Figura 17.46). En el paso final del proceso de transporte de electrones, la metanofenazina es primero reducida (por la F_{420}) y después oxidada (por un citocromo de tipo *b*), constituyendo el donador último de electrones para la heterodisulfuro reductasa (Figura 17.46).

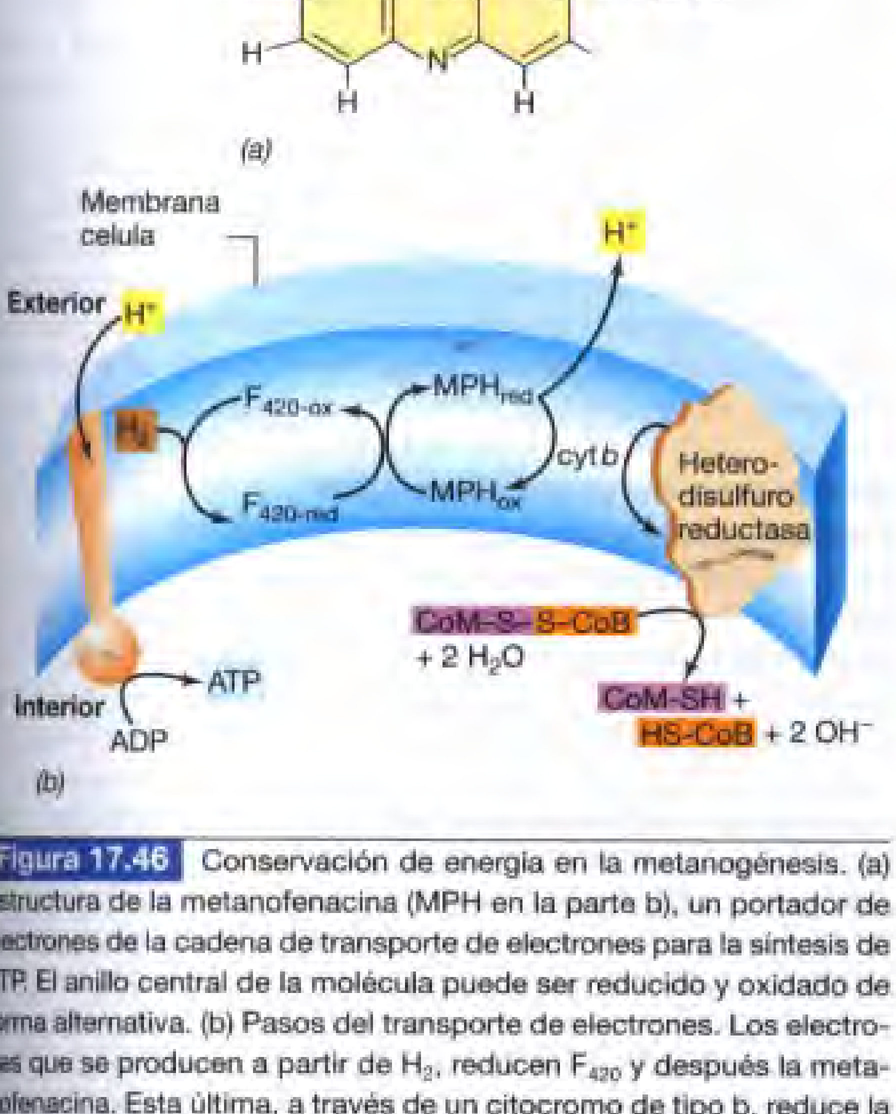


Figura 17.46 Conservación de energía en la metanogénesis. (a) Estructura de la metanofenacina (MPH en la parte b), un portador de electrones de la cadena de transporte de electrones para la síntesis de ATP. El anillo central de la molécula puede ser reducido y oxidado de forma alternativa. (b) Pasos del transporte de electrones. Los electrones que se producen a partir de H_2, reducen F_{420} y después la metanofenacina. Esta última, a través de un citocromo de tipo b, reduce la heterodisulfuro reductasa con extrusión de protones hacia el exterior de la membrana. En el paso final, la heterodisulfuro reductasa reduce Co-M-S—S-CoB a HS-CoM y HS-CoB. Para las estructuras de CoM y CoB, *véase* Figura 17.42.

La metanogénesis a partir de compuestos de metilo está ligada también a la bomba de protones de la heterodisulfuro reductasa, pero con un factor adicional. Como se ha indicado anteriormente, en ausencia de H_2 la metanogénesis a partir de compuestos como CH_3OH necesita la oxidación de algunas de esas moléculas a CO_2, para generar los electrones necesarios para la reducción de metilo a metano. Esto necesita un aporte energético, que se produce a expensas de una fuerza Na^+ motriz (un potencial de membrana cargado por Na^+, *véase* Sección 17.20). La energía inherente a este potencial procede de la conversión de CH_3–metanopterina en CH_3–CoM durante la metanogénesis; la reacción inversa consume energía y está impulsada por la bomba de Na^+. Los pasos oxidativos posteriores en la conversión del CO_2 a grupos metilo invierten los pasos enzimáticos que llevan a la formación de CH_4 a partir de CO_2 (*véase* Figura 17.44). De esta manera, en los metanógenos se encuentran dos tipos de bombas de iones: la típica bomba de protones que se usa para la síntesis de adenosina trifosfato (ATP) y una bomba de Na^+ reversible que impulsa la oxidación del grupo metilo.

✓ 17.17 Revisión de conceptos

La metanogénesis es la producción biológica de CH_4 a partir, o bien de la reducción de CO_2 con H_2, o bien de compuestos metilados. En la metanogénesis intervienen diversas coenzimas exclusivas, y el proceso es estrictamente anaerobio. En la conservación de energía en la metanogénesis intervienen gradientes de protones y de sodio.

- ✓ ¿Qué coenzimas funcionan como portadoras de C_1 en la metanogénesis? ¿Y como agentes redox?
- ✓ ¿Por qué las fases del catabolismo de CH_3OH durante la metanogénesis son diferentes si el H_2 está o no presente?
- ✓ En relación con la autotrofia, ¿por qué sólo algunas, pero no todas, enzimas de la vía del acetil-CoA están presentes en los metanógenos?
- ✓ ¿Cómo se produce fuerza protón motriz en la metanogénesis?

17.18 Hierro férrico, manganeso, clorato y aceptores orgánicos de electrones

Además de los aceptores de electrones para la respiración anaeróbica discutidos hasta ahora, el hierro férrico (Fe^{3+}), el ion mangánico (Mn^{4+}), el clorato (ClO_3^-) y varios compuestos orgánicos son aceptores de electrones importantes para las bacterias en la naturaleza (Figura 17.47). Diversas bacterias son capaces de reducir estos aceptores, especialmente el Fe^{3+}, y otras muchas pueden reducir también otros aceptores, tales como el NO_3^- y el S^0 (*véanse* Secciones 17.14 y 17.15).

Reducción de hierro férrico

El hierro férrico es un aceptor de electrones para el metabolismo energético en una amplia variedad de bacterias, tanto quimioorganotrofas como quimiolitotrofas, y, puesto que el Fe^{3+} abunda en la naturaleza, su reducción es una

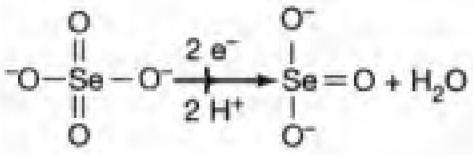
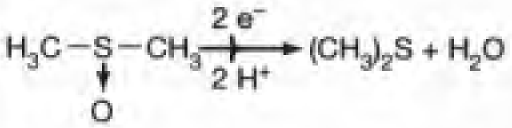
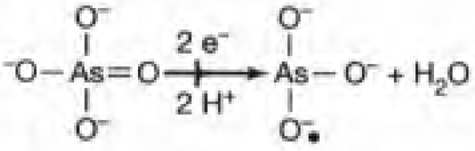
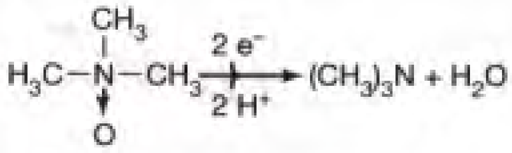
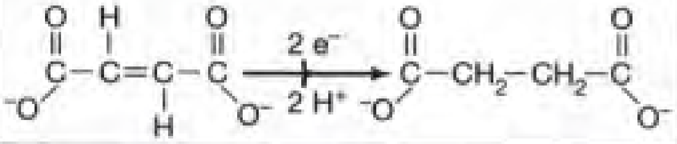
Aceptor	Reacción	E_0' del par (V)	Producto
Clorato	$ClO_3^- \xrightarrow[6\,H^+]{6\,e^-} Cl^- + 3\,H_2O$	+1,03	Clorudo
Ion mangánico	$Mn^{4+} \xrightarrow{2\,e^-} Mn^{2+}$	+0,798	Ion Manganoso
Selenato	 $^-O{-}\overset{O}{\underset{O}{Se}}{-}O^- \xrightarrow[2\,H^+]{2\,e^-} \overset{O^-}{\underset{O^-}{Se}}{=}O + H_2O$	+0,475	Selenito
Ion férrico	$Fe^{3+} \xrightarrow{e^-} Fe^{2+}$	+0,2	Ion ferroso
Dimetil sulfóxido (DMSO)	 $H_3C{-}\underset{O}{S}{-}CH_3 \xrightarrow[2\,H^+]{2\,e^-} (CH_3)_2S + H_2O$	+0,16	Dimetil sulfuro (DMS)
Arsenato	 $^-O{-}\overset{O^-}{\underset{O^-}{As}}{=}O \xrightarrow[2\,H^+]{2\,e^-} \overset{O^-}{\underset{O^-}{As}}{-}O^- + H_2O$	+0,139	Arsenito
Óxido de *N*-Trimetilamina (TMAO)	 $H_3C{-}\overset{CH_3}{\underset{O}{N}}{-}CH_3 \xrightarrow[2\,H^+]{2\,e^-} (CH_3)_3N + H_2O$	+0,13	Trimetilamina (TMA)
Fumarato	 $^-O{-}\overset{O}{C}{-}\overset{H}{C}{=}\underset{H}{C}{-}\overset{O}{C}{-}O^- \xrightarrow[2\,H^+]{2\,e^-} {^-O}{-}\overset{O}{C}{-}CH_2{-}CH_2{-}\overset{O}{C}{-}O^-$	+0,03	Succinato

Figura 17.47 Algunos aceptores de electrones alternativos en las respiraciones anaeróbicas.

forma importante de respiración anaeróbica. El potencial de reducción del par Fe^{3+}/Fe^{2+} es ligeramente electropositivo ($E^{0\prime} = +0{,}2$ V a pH 7) y, a causa de ello, la reducción de Fe^{3+} puede acoplarse a la oxidación de algunos donadores de electrones orgánicos e inorgánicos. Diversos compuestos, entre ellos los aromáticos, son oxidados anaeróbicamente por los reductores del hierro férrico con electrones que se desplazan a través de las cadenas de transporte de electrones que terminan en un sistema hierro férrico reductasa. Este flujo de electrones establece una fuerza protón motriz que puede usarse para generar ATP. Una buena parte de la investigación sobre la energética de la reducción del hierro férrico se ha llevado a cabo con la bacteria Gram negativa *Shewanella putrefaciens*, en la que el crecimiento anaeróbico dependiente de Fe^{3+} tiene lugar con varios donadores orgánicos de electrones. Otros reductores importantes de Fe^{3+} son *Geobacter*, *Geospirillum* y *Geovibrio*.

Geobacter metallireducens se ha usado como modelo para el estudio de la fisiología de la reducción de Fe^{3+}. Este organismo puede oxidar acetato con Fe^{3+} como aceptor, de la forma siguiente:

$$\text{Acetato}^- + 8\,Fe^{3+} + 4\,H_2O \rightarrow$$
$$2\,HCO_3^- + 8\,Fe^{2+} + 9\,H^+ \qquad \Delta G^{0\prime} = -233\ \text{kJ}$$

Geobacter puede usar también H_2 u otros donadores de electrones, como el hidrocarbono aromático tolueno (*véase* en la Figura 17.56*d* la estructura del tolueno). Esto puede tener importancia ecológica porque el tolueno procedente de los vertidos de los tanques de almacenamiento de hidrocarburos a menudo contamina los acuíferos ricos en hierro férrico. Se ha indicado la posibilidad de que *Geobacter* pudiera ser muy útil como agente descontaminante en esos ambientes.

Reducción de manganeso (Mn^{4+}) y otras sustancias inorgánicas

El metal manganeso tiene varios estados de oxidación, siendo el Mn^{4+} y el Mn^{2+} las formas más estables y biológicamente relevantes. La reducción anóxica de Mn^{4+} a Mn^{2+} la llevan a cabo muchos microorganismos, en su mayor parte quimioorganotrofos. En *Shewanella putrefaciens* y en algunas otras bacterias, el crecimiento anóxico en acetato y otras fuentes de carbono no fermentables tiene lugar con Mn^{4+} como aceptor de electrones. El potencial de reducción del par Mn^{4+}/Mn^{2+} es extremadamente alto (Figura 17.47); por tanto, varios compuestos tendrían que ser capaces de ceder electrones para la reducción de Mn^{4+}. Éste es también el caso del clorato, ya que su potencial de reducción es incluso *más positivo* que el del par O_2/H_2O (Figura 17.47). Se han aislado varias bacterias reductoras de clorato, la mayoría de ellas son facultativas y, por tanto, capaces también de crecer en condiciones aeróbicas.

Otras sustancias inorgánicas pueden funcionar como aceptores de electrones en la respiración anaerobia. Entre

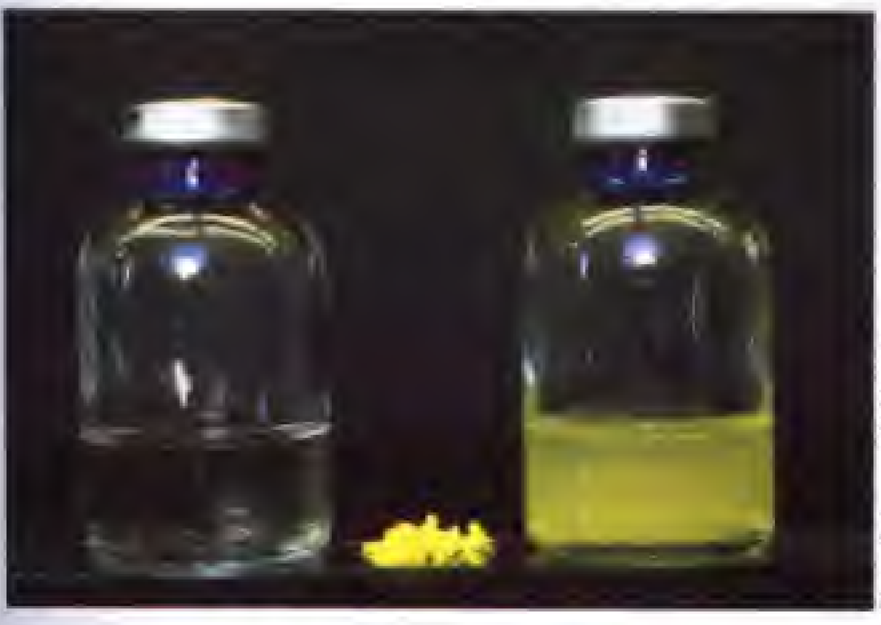

Dianne K. Newman y Stephen Tay

Figura 17.48 Producción del mineral trisulfuro de arsénico (As_2S_3) durante la reducción de arsenato por la bacteria sulfato reductora *Desulfotomaculum auripigmentum*. En la parte izquierda, aspecto de una botella de cultivo después de la inoculación. A la derecha, crecimiento al cabo de dos semanas. En el centro, muestra de As_2S_3 sintético. La producción de minerales por microorganismos se denomina *biomineralización*.

ellas se encuentran compuestos de selenio y arsénico (Figura 17.47). Aunque normalmente no se encuentran en grandes cantidades en ambientes naturales, los derivados del selenio y el arsénico son agentes contaminantes ocasionales y pueden sostener el crecimiento anaeróbico de diversas bacterias. La reducción de SeO_4^{2-} a SeO_3^{2-} y posteriormente a Se^0 (selenio metálico) es un método importante de eliminación de selenio del agua y se ha usado como medio de limpieza (biorremedio) (*véase* Sección 19.19) de suelos contaminados con selenio.

En el caso del arsénico, la bacteria sulfato reductora *Desulfotomaculum* puede reducir arsenato (AsO_4^{3-}) a arsenito (AsO_3^{3-}), junto con SO_4^{2-} (a HS^-), y en el proceso se forma un complejo mineral de arsénico y sulfuro, As_2S_3, que precipita espontáneamente (Figura 17.48). El mineral se forma tanto extracelular como intracelularmente y es un ejemplo de *biomineralización*, es decir, la formación de un mineral por acción bacteriana. En este caso, la formación de As_2S_3 (Figura 17.48) constituye un método de detoxificar lo que de otra forma sería un componente tóxico (en este caso el arsénico), y esas actividades pueden tener aplicaciones prácticas para la descontaminación microbiana de desechos tóxicos.

Aceptores orgánicos de electrones

Algunos compuestos orgánicos de electrones participan como aceptores externos de electrones en la respiración anaeróbica. De los que se indican en la Figura 17.47, el compuesto más extensamente estudiado es el **fumarato**, que es reducido a **succinato**. Un examen del *ciclo del ácido cítrico* (*véase* Figura 5.22) revela que el fumarato y el succinato son intermediarios importantes. La función del fumarato como aceptor de electrones en la respiración anaeróbica proviene del hecho de que el par fumarato/succinato tiene un potencial de reducción cercano a 0 V (*véase* Figura 17.35), lo que permite acoplar la reducción del fumarato a la oxidación de NADH o de H_2. El rendimiento energético es suficiente para la síntesis de un ATP. Las bacterias capaces de usar fumarato como aceptor incluyen *Wolinella succinogenes* (que puede crecer con H_2 como donador de electrones usando fumarato como aceptor), *Desulfovibrio gigas* (una bacteria sulfato reductora que puede crecer en condiciones no sulfato reductoras), algunos clostridios, *Escherichia coli* y muchas otras bacterias.

El **óxido de trimetilamina** (TMAO), que se muestra en la Figura 17.47, es un interesante aceptor orgánico de electrones. El TMAO es un soluto con funciones osmóticas importantes en los peces marinos, donde sirve como medio de excretar el exceso de nitrógeno. Diversas bacterias son capaces de reducir TMAO a trimetilamina (TMA). La TMA tiene un fuerte olor y sabor, y parte del olor característico del pescado en descomposición se debe a la TMA producida por acción bacteriana. Diversas bacterias aerobias facultativas son capaces de utilizar TMAO como aceptor de electrones alternativo. Además, varias bacterias fototróficas rojas (*véase* Sección 12.2) pueden usar TMAO como aceptor de electrones para el metabolismo anaeróbico en la oscuridad. Un compuesto análogo a TMAO es el **dimetilsulfóxido** (DMSO), que muchas bacterias reducen a dimetilsulfuro (DMS). El DMSO es un producto natural muy común y se encuentra en ambientes de agua marina y de agua dulce. El DMS tiene un olor picante fuerte, y la reducción bacteriana de DMSO a DMS se delata por el olor característico del DMS. Bacterias muy diversas, como *Campylobacter*, *Escherichia* y muchas proteobacterias pueden usar DMSO como aceptor de electrones para la generación de energía (en la Sección 19.13 se discute el metabolismo del DMSO).

Los potenciales de reducción de los pares TMAO/TMA y DMSO/DMS son similares, próximos a +0,15 V, lo que significa que cualquier cadena de transporte de electrones que termine con la reducción de TMAO o DMSO tiene que ser bastante corta. Al igual que en la reducción de fumarato, en la mayoría de casos de reducción de TMAO y DMSO se han identificado como oxidasas terminales citocromos de tipo *b* (con potenciales de reducción cercanos a 0 V).

Compuestos halogenados como aceptores de electrones: decloración reductora

Algunos compuestos clorados funcionan como aceptores de electrones para la respiración anaeróbica en el proceso conocido como *decloración reductora*. Por ejemplo, *Desulfomonile* crece de forma anaeróbica con H_2 o compuestos orgánicos donadores de electrones, con clorobenzoato como aceptor:

$$\underset{\text{3-Clorobenzoato}}{C_7H_4O_2Cl^-} + 2\,H \rightarrow \underset{\text{Benzoato}}{C_7H_5O_2^-} + HCl$$

Además de *Desulfomonile*, que es también una bacteria sulfato reductora (Tabla 17.5), hay una amplia variedad de bacterias que pueden llevar a cabo la decloración reductora; algunas sólo pueden utilizar compuestos clorados como aceptores de electrones (Tabla 17.5). Muchos de los compuestos clorados reducidos son tóxicos para los peces y otros animales, en tanto que bastantes productos de la de-

TABLA 17.5 Características de los principales géneros de bacterias que realizan decloración reductora

Propiedad	Género			
	Dehalobacter	***Desulfomonile***	***Desulfitobacterium***	***Dehalococcoides***
Donadores de electrones	H_2	H_2, formiato, piruvato lactato y benzoato	H_2, formiato y piruvato lactato	H_2 y lactato
Aceptores de electrones	Tricloroetileno y tetracloroetileno	Metaclorobenzoatos, tetracloroetileno y SO_3^{2-}, $S_2O_3^{2-}$ y S^0	Ortho-, meta- o paraclorofenoles, NO_3^-, fumarato, SO_3^{2-}, $S_2O_3^{2-}$ y S^0	Tricloroetileno y tetracloroetileno
Producto de la reducción de tetracloroetileno	Dicloroetileno	Dicloroetileno	Tricloroetileno	Eteno
Otras propiedades[a]	Contiene citocromo *b*	Contiene citocromo c_3; requiere fuente de carbono orgánico; puede crecer por fermentación de piruvato	Puede crecer también por fermentación	Carece de peptidoglicano
Filogenia[b]	Relacionado con miembros Gram positivos de bajo GC del dominio *Bacteria*	Relacionado con el grupo delta de las proteobacterias	Relacionado con miembros Gram positivos de bajo GC del dominio *Bacteria*	Linaje especial del *dominio Bacteria*

[a] Todos los organismos son anaerobios estrictos.

[b] *Véanse* Capítulo 12 y Figura 12.1 para un tratamiento detallado de la filogenia procariótica.

cloración son menos tóxicos o carecen completamente de toxicidad. Por ejemplo, la bacteria *Dehalococcoides* reduce tri- y tetracloroetileno al gas eteno, que es inocuo (Tabla 17.5). *Dehalobacterium* convierte el compuesto tóxico diclorometano (CH_2Cl_2) en acetato más formiato (Tabla 17.5). De esta forma, la decloración reductora es no sólo una forma de metabolismo energético, sino un proceso de biorremedio ecológicamente significativo (*véase* Sección 19.19). Numerosos decloradores reductores son capaces también de reducir nitrato o varios compuestos, reducidos de azufre (Tabla 17.5), con lo que el grupo está formado por especies a la vez oportunistas y especialistas.

✓ 17.18 Revisión de conceptos

Además de compuestos inorgánicos de nitrógeno o de azufre, o de CO_2, otras sustancias muy variadas, tanto orgánicas como inorgánicas, pueden funcionar como aceptores de electrones en la respiración anaeróbica. En particular, éstas incluyen Fe^{3+}, Mn^{4+}, fumarato y compuestos clorados.

- ✓ Con H_2 como donador de electrones, ¿por qué la reducción de Fe^{3+} es una reacción más favorable que la de fumarato?
- ✓ Proporciónese un ejemplo de *biomineralización*.
- ✓ ¿En qué lugar de la naturaleza podrían ser abundantes las bacterias degradadoras de TMAO? ¿Por qué?
- ✓ ¿Qué es la decloración reductora?

17.19 Fermentaciones: consideraciones energéticas y redox

Como el oxígeno no es muy soluble (9,6 mg/l de agua destilada en equilibrio con el aire a 25°C), muchos ambientes se hacen anóxicos con relativa facilidad. En tales ambientes, la descomposición de la materia orgánica ocurre anaeróbicamente. Si en esos ambientes anóxicos no existe un suministro adecuado de aceptores de electrones como SO_4^{2-}, NO_3^-, Fe^{3+} y otros considerados en las secciones anteriores, gran parte del carbono será catabolizado por fermentación. (El CO_2 como aceptor de electrones es una excepción. Aunque es raramente limitante en hábitat anóxicos, su conversión a metano requiere H_2, y este último es por sí mismo producto de fermentaciones.) En las Secciones 5.9 y 5.10, se ha comentado el proceso global de las fermentaciones y se ha mostrado que es un proceso de óxido-reducción equilibrado internamente, donde el carbono del mismo compuesto orgánico externo en parte se oxida y en parte se reduce (Figura 17.49).

Si un organismo cataboliza compuestos orgánicos en el metabolismo energético, tiene que solucionar dos problemas: (1) conservar parte de la energía liberada para tener ATP, y (2) eliminar los electrones extraídos del donador de electrones. En la fermentación, la síntesis de ATP se pro-

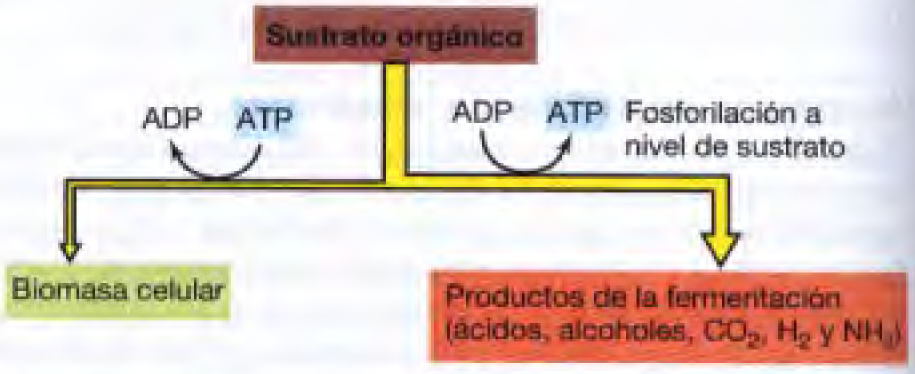

Sustrato orgánico
ADP
ATP
ADP
ATP
Fosforilación a nivel de sustrato
Biomasa celular
Productos de la fermentación (ácidos, alcoholes, CO2, H2 y NH3)

Figura 17.49 Proceso global de la fermentación. En una fermentación típica, la mayor parte del carbono se excreta como un producto final parcialmente reducido del metabolismo energético, y que sólo una pequeña cantidad se usa en la biosíntesis.

TABLA 17.6 Compuestos ricos en energía que intervienen en la fosforilación a nivel de sustrato[a]

Compuesto	Energía libre de la hidrólisis, $\Delta G^{0\prime}$ (kJ/mol)[b]
Acetil-CoA	−35,7
Propionil-CoA	−35,6
Butiril-CoA	−35,6
Succinil-CoA	−35,1
Acetilfosfato	−44,8
Butirilfosfato	−44,8
1,3-Bisfosfoglicerato	−51,9
Carbamilfosfato	−39,3
Fosfoenolpiruvato	−51,6
Adenosina fosfosulfato (APS)	−88
N^{10}-formiltetrahidrofolati	−23,4
Energía de hidrólisis del ATP ($ATP \rightarrow ADP + P_i$)	−31,8

[a] Datos tomados de R. K. Thauer, K. Jungermann y K. Decker. 1977. «Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria». *Bacteriol. Rev.* 41: 100-180.

[b] Los valores $\Delta G^{0\prime}$ que se muestran aquí son para «condiciones estándar», que no son necesariamente las de las células. Incluyendo la pérdida de calor, el coste de energía para fabricar un ATP se aproxima más a los 60 kJ que a los 32 kJ, por lo que la energía de la hidrólisis de los compuestos de alta energía que se muestran aquí son seguramente más elevados. A efectos comparativos y de simplificación, los valores de esta tabla se toman como la energía real liberada por reacción.

duce generalmente mediante *fosforilación a nivel de sustrato*, un mecanismo por el que los enlaces fosfato de alta energía de los intermediarios orgánicos de la fermentación se transfieren al ADP (*véase* Sección 5.9). El segundo problema, el del equilibrio redox, se soluciona mediante la producción y secreción por el organismo de los *productos de fermentación* generados a partir del sustrato original (Figuras 17.49 y 17.50). Consideremos estos principios básicos de la fermentación con más detalle y resaltemos la enorme diversidad de las fermentaciones microbianas conocidas.

Compuestos de alta energía y fosforilación a nivel de sustrato

Hay muchas y diferentes formas de conservar la energía de la fosforilación a nivel de sustrato. Sin embargo, el mecanismo central de la síntesis de ATP es la producción de un *compuesto de alta energía*. En general, éstos son compuestos orgánicos que contienen un grupo fosfato o una molécula de coenzima A, cuya hidrólisis es altamente exergónica. La Tabla 17.6 presenta una lista de los principales intermediarios de alta energía. Esta lista no es completa, pero incluye la mayor parte de los intermediarios conocidos de alta energía que se forman durante los procesos bioquímicos. Como la mayoría de los compuestos indicados en la Tabla 17.6 se pueden acoplar directamente a la síntesis de ATP (−31,8 kJ/mol), un organismo podrá hacer ATP si puede formar uno u otro de estos compuestos durante el metabolismo fermentativo. La fosforilación a nivel de sustrato es un modo más directo de producir ATP que la fuerza protón motriz (*véase* Figura 5.13), pero requiere que la fuente de energía se acople directamente a un intermediario de alta energía.

La Figura 17.50 resume las vías de descomposición anaeróbica de varias sustancias fermentables hasta intermediarios de alta energía. Obsérvese que esta figura se organiza en función de los compuestos de alta energía indicados en la Tabla 17.6 y que, en cada caso, se genera uno de estos compuestos, o un derivado relacionado, y se origina la síntesis de ATP. Por tanto, la Figura 17.50 y la Tabla 17.6 deberían examinarse conjuntamente.

Rendimiento energético de organismos fermentativos

¿Cuál es la cantidad de ATP que puede producir un organismo fermentativo? Hemos visto que los fermentadores de glucosa producen de 2 a 3 ATPs por glucosa fermentada en la glicólisis (*véase* Figura 5.14). Ésta es la máxima cantidad de ATP que se obtiene por fermentación; muchas otras sustancias aportan menos energía. La energía potencial liberada de una fermentación determinada se calcula a partir de la reacción equilibrada y de los valores de energía libre dados en el Apéndice 1. Por ejemplo, la fermentación de glucosa a etanol y CO_2 tiene un rendimiento energético teórico de −235 kJ/mol, suficiente para producir 7 ATPs. Sin embargo, en realidad sólo se obtienen 2 ATPs, lo que significa que el organismo opera con una eficiencia considerablemente inferior al 100%, perdiendo parte de la energía en forma de calor.

Equilibrio de oxidación-reducción

Toda reacción fermentativa comporta un *equilibrio* entre oxidación y reducción. El número total de electrones en los productos del lado derecho de la ecuación debe guardar un equilibrio con el número de electrones en los sustratos del lado izquierdo. Cuando se estudian las fermentaciones experimentalmente en el laboratorio se suele calcular un *balance de fermentación* para asegurar que algunos productos no pasen desapercibidos. Este balance también puede calcularse teóricamente a partir de los estados de oxidación de los sustratos y de los productos (*véase* Apéndice 1 para el cálculo de los estados de oxidación).

En algunas fermentaciones, el equilibrio de electrones se mantiene por la producción de hidrógeno molecular, H_2. Los protones (H^+) derivados del agua sirven como aceptores de electrones en la producción de H_2. Con frecuencia, esta producción se asocia con la presencia en el organismo de una ferrosulfoproteína denominada *ferredoxina*, un transportador de electrones de muy bajo potencial. El transporte de electrones desde la ferredoxina a H^+ está catalizado por la enzima **hidrogenasa**, como se ilustra en la Figura 17.51. De hecho, la energética de la producción de hidrógeno es en parte desfavorable, por lo que la mayoría de organismos fermentadores sólo producen una cantidad relativamente pequeña de hidrógeno, junto con otros productos de la fermentación. De esta forma, la función principal de la producción de hidrógeno es mantener el equilibrio redox.

Muchas bacterias anaerobias producen *acetato* como uno de los productos de la fermentación. La producción de acetato o de algunos otros ácidos grasos (*véase* Tabla 17.6) es energéticamente ventajosa porque permite al organismo fabricar ATP por fosforilación a nivel de sustrato. El inter-

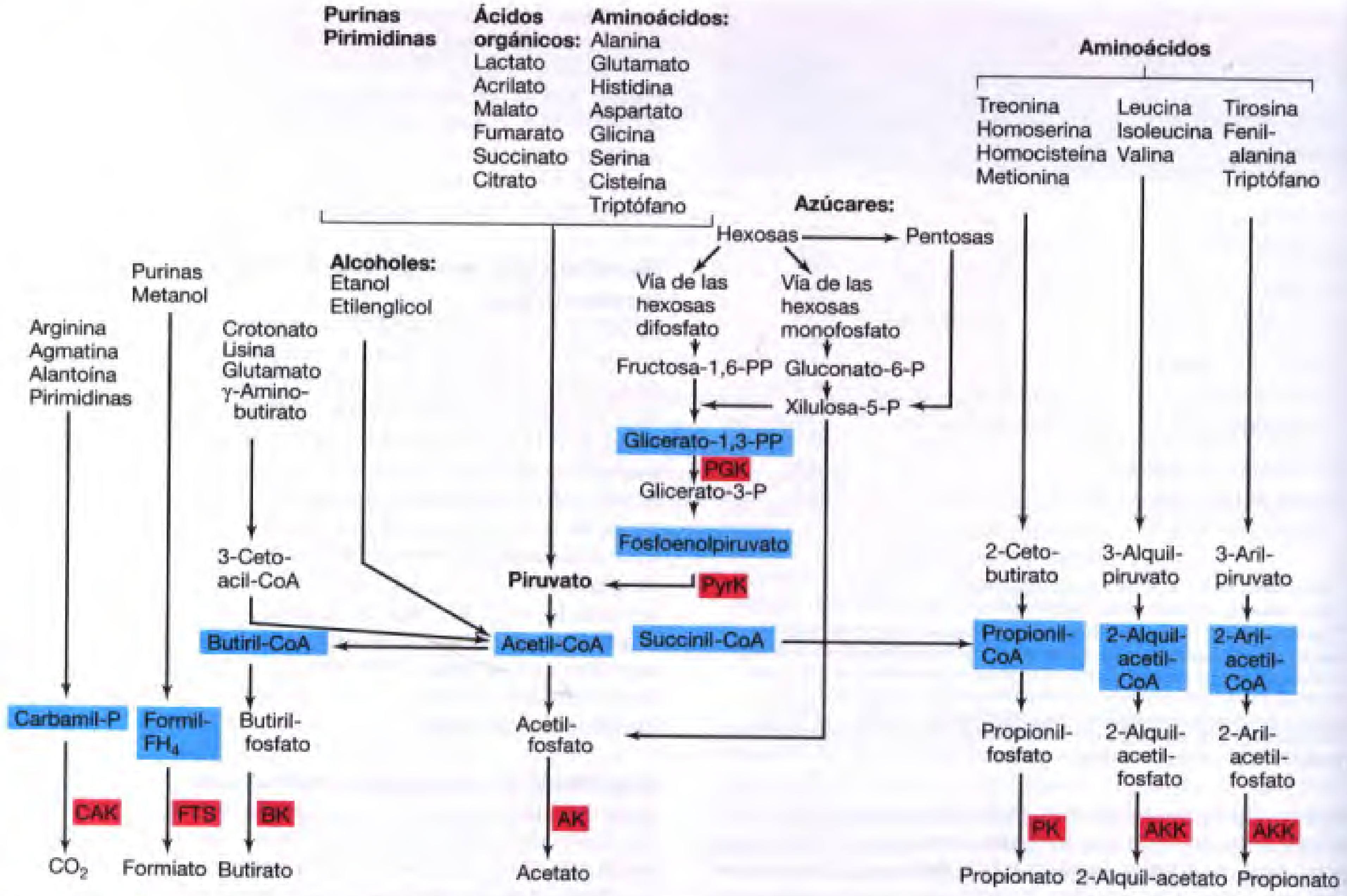

Purinas
Pirimidinas
Ácidos orgánicos:
Lactato
Acrilato
Malato
Fumarato
Succinato
Citrato
Aminoácidos:
Alanina
Glutamato
Histidina
Aspartato
Glicina
Serina
Cisteína
Triptófano
Aminoácidos
Treonina
Homoserina
Homocisteína
Metionina
Leucina
Isoleucina
Valina
Tirosina
Fenil-alanina
Triptófano
Azúcares:
Hexosas
Pentosas
Vía de las hexosas difosfato
Vía de las hexosas monofosfato
Fructosa-1,6-PP
Gluconato-6-P
Xilulosa-5-P
Glicerato-1,3-PP
PGK
Glicerato-3-P
Fosfoenolpiruvato
PyrK
Piruvato
Purinas
Metanol
Alcoholes:
Etanol
Etilenglicol
Arginina
Agmatina
Alantoína
Pirimidinas
Crotonato
Lisina
Glutamato
γ-Amino-butirato
3-Ceto-acil-CoA
Butiril-CoA
Acetil-CoA
Succinil-CoA
Carbamil-P
Formil-FH₄
Butiril-fosfato
Acetil-fosfato
CAK
FTS
BK
AK
CO₂
Formiato
Butirato
Acetato
2-Ceto-butirato
3-Alquil-piruvato
3-Aril-piruvato
Propionil-CoA
2-Alquil-acetil-CoA
2-Aril-acetil-CoA
Propionil-fosfato
2-Alquil-acetil-fosfato
2-Aril-acetil-fosfato
PK
AKK
AKK
Propionato
2-Alquil-acetato
Propionato

Figura 17.50 Principales vías para la rotura anaeróbica de diversas sustancias fermentables. Los lugares de fosforilación a nivel de sustrato se indican mediante las abreviaturas de las enzimas implicadas. CAK, carbamil fosfato quinasa; FTS, formiltetrahidrofolato sintetasa; AK, acetato quinasa; PK, propionato quinasa; BK, butirato quinasa; AKK, alquil (aril) acetato quinasa; PGK, fosfoglicerato quinasa y PyrK, piruvato quinasa. Los derivados del CoA con alta energía y otros compuestos clave de alta energía se destacan en azul y las enzimas en rojo. Compárese con la Tabla 17.6.

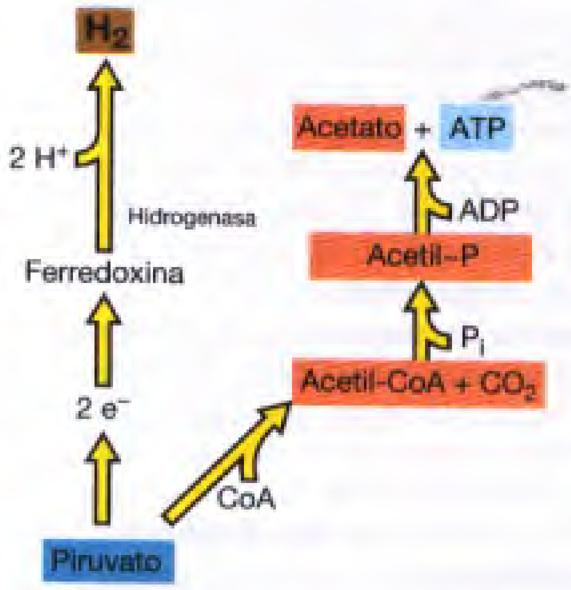

H₂
2 H⁺
Hidrogenasa
Ferredoxina
2 e⁻
Acetato + ATP
ADP
Acetil-P
Pᵢ
Acetil-CoA + CO₂
CoA
Piruvato

Figura 17.51 Producción de hidrógeno molecular y acetato a partir de piruvato. Obsérvese que la producción de acetato conduce a la síntesis de ATP mediante la hidrólisis del intermediario de alta energía, acetilfosfato (*véase* Tabla 17.6).

mediario clave generado en la producción de acetato es el acetil-CoA (*véanse* Tabla 17.6 y Figura 17.50), elevadamente energético. El acetil-CoA se convierte en acetilfosfato (también indicado en la Tabla 17.6), y el grupo fosfato de alta energía del acetilfosfato se transfiere posteriormente a la adenosina difosfato (ADP) mediante la acetato quinasa, dando ATP. Uno de los principales sustratos que se convierten en acetil-CoA es el piruvato, un producto importante de la glicólisis. La conversión de piruvato en acetil-CoA es una reacción de oxidación (Figura 17.51) y el exceso de electrones generados debe usarse para fabricar un producto final más reducido, o para producir H_2, tal como se ha comentado anteriormente.

✓ 17.19 Revisión de conceptos

En ausencia de un aceptor externo de electrones, los compuestos orgánicos sólo se pueden catabolizar por fermentación. Solamente determinados compuestos son fermentables y para la mayor parte de las fermentaciones es necesario que se forme un intermediario de alta energía que produzca ATP por fosforilación a nivel de sustrato. En las fermentaciones también se debe lograr un equilibrio redox, y la producción de H_2 es una de las maneras de deshacerse del exceso de electrones.

- ✓ ¿Qué es la *fosforilación a nivel de sustrato*?
- ✓ ¿Por qué es ventajosa, en términos energéticos, la formación de acetato en la fermentación?

17.20 Diversidad fermentativa

La clasificación de las fermentaciones se realiza basándose en los sustratos fermentados o en los productos formados. Muchas reacciones de fermentación específicas de las bacterias se han tratado en los Capítulos 12 y 13 al examinar los grupos individuales. Lo que sigue es una perspectiva global de las fermentaciones más comunes.

Diversidad de las fermentaciones

La Tabla 17.7 muestra algunos de los principales tipos de fermentaciones, clasificadas sobre la base de los *productos formados*. Algunas categorías son amplias, como la alcohólica, la del ácido láctico, la del ácido propiónico, la ácido mixta, la del ácido butírico y la del ácido homoacético. Hay fermentaciones que se clasifican por el *sustrato fermentado*, en vez de por los productos de fermentación; por ejemplo, muchas bacterias anaerobias formadoras de esporas (género *Clostridium*) fermentan *aminoácidos* y producen acetato, amoníaco y H_2 (*véase* Figura 12.59). Otras especies de *Clostridium*, como *C. acidi-urici* y *C. purinolyticum*, fermentan *purinas* tales como xantina o adenina, con la formación de acetato, formiato, CO_2 y amoníaco. Hay todavía otros anaerobios que fermentan *compuestos aromáticos*, como por ejemplo *Pelobacter acidigallici*, que fermenta el floroglucinol (1,3,5-bencenotriol, $C_6H_6O_3$) a través de la siguiente reacción global:

$$\text{Floroglucinol } (C_6H_6O_3) + 3\,H_2O \rightarrow 3 \text{ acetato}^- + 3\,H^+ \qquad \Delta G^{0\prime} = -142{,}5 \text{ kJ/reacción}$$

Muchas fermentaciones que son poco comunes sólo las llevan a cabo un grupo muy restringido de anaerobios y, en algunos casos, sólo una bacteria conocida. Algunos ejemplos se indican en la Tabla 17.8. Muchas de estas bacterias se pueden considerar especialistas metabólicos y han desarrollado capacidades bioquímicas para catabolizar uno o más sustratos no catabolizados por otras bacterias. Sin embargo, como en el caso de las sustancias indicadas en la Tabla 17.7, para fermentar con éxito estos sustratos poco frecuentes es necesario que el organismo produzca durante la fermentación un intermediario de alta energía, a fin de conservar parte de la energía liberada en forma de ATP. Normalmente, este intermediario es un derivado de la coenzima A como los que aparecen en la Tabla 17.6.

Fermentaciones sin fosforilación a nivel de sustrato: descarboxilaciones de ácidos orgánicos

Aunque con algunos sustratos no se libera la suficiente energía para la síntesis directa de ATP por fosforilación a nivel de sustrato, estos compuestos, sin embargo, sí permiten

TABLA 17.7 Ejemplos de fermentaciones bacterianas comunes y algunos de los microorganismos que las realizan

Tipo	Reacción global[a]	Microorganismos
Fermentación alcohólica	Hexosa → 2 Etanol + 2 CO_2	Levaduras *Zymomonas*
Fermentación homoláctica	Hexosa → 2 Lactato^- + 2 H^+	*Streptococcus* Algunos *Lactobacillus*
Fermentación heteroláctica	Hexosa → Lactato^- + Etanol + CO_2 + H^+	*Leuconostoc* Algunos *Lactobacillus*
Ácido propiónico	Lactato^- → Propionato^- + Acetato^- + CO_2	*Propionibacterium* *Clostridium propionicum*
Ácido-mixta	Hexosa → Etanol + 2,3-Butanodiol + Succinato^{2-} + Lactato^- + Acetato^- + Formiato^- + H_2 + CO_2	Bacterias entéricas *Escherichia* *Salmonella* *Shigella* *Klebsiella* *Enterobacter*
Ácido butírico	Hexosa → Butirato^- + Acetato^- + H_2 + CO_2	*Clostridium butyricum*
Butanol	Hexosa → Butanol + Acetato^- + Acetona + Etanol + H_2 + CO_2	*Clostridium acetobutylicum*
Caproato	Etanol + Acetato^- + CO_2 → Caproato^- + Butirato^- + H_2	*Clostridium kluyveri*
Homoacetogénica	Fructosa → 3 Acetato^- + 3 H^+ 4 H_2 + 2 CO_2 + H^+ → Acetato^- + 2 H_2O	*Clostridium aceticum* *Acetobacterium*
Metanogénica	Acetato^- + H_2O → CH_4 + HCO_3^-	*Methanosaeta* *Methanosarcina*

[a] Representación global del proceso. La estequiometría puede no ser exacta.

TABLA 17.8 Algunas fermentaciones bacterianas poco frecuentes

Tipo	Reacción global equilibrada	Microorganismos
Acetileno	$2\ C_2H_2 + 3\ H_2O \rightarrow$ etanol + acetato$^-$ + H^+	*Pelobacter acetylenicus*
Glicerol	4 Glicerol + $2\ HCO_3^- \rightarrow$ 7 acetato$^-$ + 5 H+ + $4\ H_2O$	*Acetobacterium* spp.
Resorcinol (un compuesto aromático)	$2\ C_6H_4(OH)_2 + 6\ H_2O \rightarrow$ 4 acetato$^-$ + butirato$^-$ + $5\ H^+$	*Clostridium* spp.
Floroglucinol (un compuesto aromático)	$C_6H_6O_3 + 3\ H_2O \rightarrow$ 3 acetato$^-$ + $3\ H^+$	*Pelobacter massiliensis* *Pelobacter acidigallici*
Putrescina	$10\ C_4H_{12}N_2 + 26\ H_2O \rightarrow$ 6 acetato$^-$ + 7 butirato$^-$ + $20\ NH_4^+ + 16\ H_2 + 13\ H^+$	Anaerobios Gram positivos no esporulados sin clasificar
Citrata	Citrato^{3-} + $2\ H_2O \rightarrow$ formiato$^-$ + 2 acetato$^-$ + HCO_3^- + H^+	*Bacteroides* sp.
Aconitato	Aconitato^{3-} + $H^+ + 2\ H_2O \rightarrow CO_2$ + 2 acetato$^-$ + H_2	*Acidaminococcus fermentans*
Glioxilato	4 Glioxilato$^-$ + $3\ H^+ + 3\ H_2O \rightarrow 6\ CO_2 + 5\ H_2$ + glicolato$^-$	Bacteria Gram negativa no clasificada
Succinato	Succinato^{2-} + $H_2O \rightarrow$ propionato$^-$ + HCO_3^-	*Propionigenium modestum*
Oxalato	Oxalato^{2-} + $H_2O \rightarrow$ formiato$^-$ + HCO_3^-	*Oxalobacter formigenes*
Malonato	Malonato^{2-} + $H_2O \rightarrow$ acetato$^-$ + HCO_3^-	*Malonomonas rubra* *Sporomusa malonica*

el crecimiento fermentativo de un organismo. En estos casos, el catabolismo del sustrato está ligado a bombas iónicas que establecen un gradiente de protones o de sodio a través de la membrana. Como ejemplos están las fermentaciones de *Propionigenium modestum* y *Oxalobacter formigenes;* ambos microorganismos acoplan la fermentación de ácidos dicarboxílicos a bombas iónicas de membrana ligadas a la obtención de energía. *Propionigenium modestum* lleva a cabo la siguiente reacción:

$$\text{Succinato}^{2-} + H_2O \rightarrow \text{propionato}^- + HCO_3^- \qquad \Delta G^{0\prime} = -20{,}5\ \text{kJ/reacción}$$

La energía libre generada por esta reacción es insuficiente para acoplarla directamente a la síntesis de ATP por fosforilación a nivel de sustrato, pero es la única reacción que suministra energía para el crecimiento del organismo. Esto es posible porque la descarboxilación del succinato por *Propionigenium modestum* (vía metilmalonil-CoA y su descarboxilasa ligada a membrana) está acoplada a la salida de Na^+ a través de la membrana citoplasmática (Figura 17.52*a*). En la membrana de *P. modestum*, una ATPasa translocadora de Na^+ emplea este gradiente de Na^+ para impulsar la síntesis de ATP (Figura 17.52*a*).

Oxalobacter formigenes lleva a cabo la fermentación de oxalato:

$$\text{Oxalato}^{2-} + H_2O \rightarrow \text{formiato}^- + HCO_3^- \qquad \Delta G^{0\prime} = -26{,}7\ \text{kJ/reacción}$$

A pH neutro, el oxalato está en forma ionizada como oxalato^{2-}, y su descarboxilación a formiato consume un protón. La posterior salida del formiato de la célula permite gene-

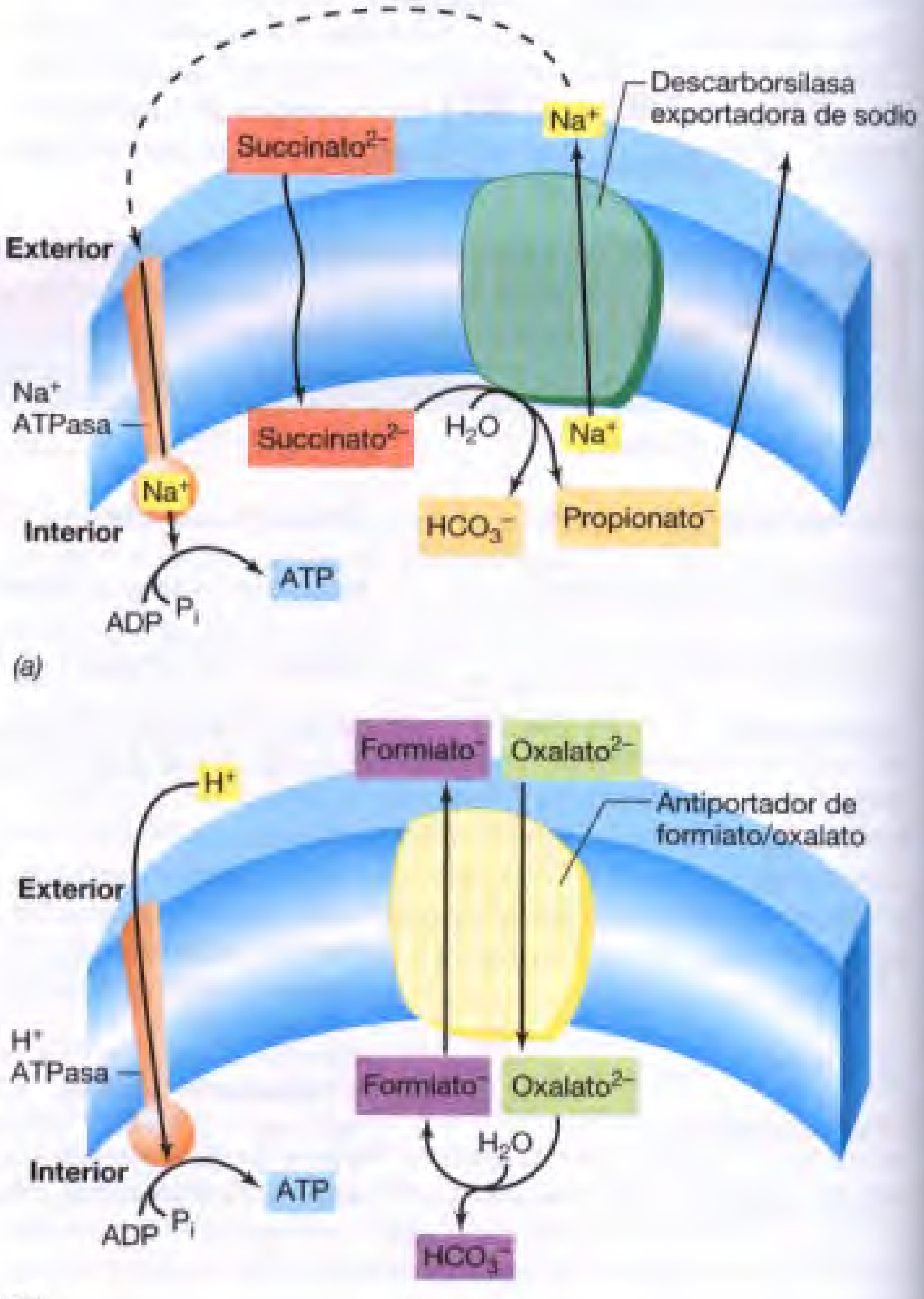


Figura 17.52 Fermentaciones exclusivas de succinato y oxalato. (a) Fermentación de succinato por *Propionigenium modestum*. Una ATPasa translocadora de sodio produce ATP; la salida de sodio está ligada a la energía liberada por la descarboxilación de succinato. (b) Fermentación de oxalato por *Oxalobacter formigenes*. La entrada de oxalato y la salida de formiato por un antiportador formiato-oxalato consume protones. La síntesis de ATP está ligada a una ATPasa activada por protones. Todos los sustratos y productos de una reacción dada se muestran en colores contrastados.

rar una fuerza protón motriz capaz de acoplarse a la síntesis de ATP por una ATPasa translocadora de protones de la membrana (Figura 17.52*b*).

El interés y singularidad tanto de *Propionigenium modestum* como de *Oxalobacter formigenes* estriba en el hecho de que la síntesis de ATP tiene lugar sin fosforilación a nivel de sustrato *ni* transporte de electrones. Sin embargo, sigue habiendo una formación quimiostática de ATP como resultado de una bomba de Na^+ o de H^+, ligada a la descarboxilación de ácidos orgánicos. Por tanto, no puede desecharse que cualquier reacción química que suministre menos de los 31,8 kJ necesarios para hacer un ATP (*véase* Tabla 17.6) sea capaz de sustentar el crecimiento de una bacteria. Si la reacción puede acoplarse a un gradiente iónico, sigue siendo posible producir ATP (y el crecimiento consiguiente). Sin embargo, dado que es necesaria la entrada de aproximadamente 3 H^+ (o 3 Na^+) para la formación de ATP por una ATPasa asociada a membrana, para ser teóricamente capaz de sustentar el crecimiento una reacción debe proporcionar al menos la energía necesaria para bombear un solo ion H^+ o Na^+ al exterior de la membrana celular.

✓ 17.20 Revisión de conceptos

Se conoce una amplia variedad de fermentaciones y en muchos casos el producto de la fermentación de un organismo es fermentado por un segundo organismo. Algunas fermentaciones emplean gradientes iónicos (H^+ o Na^+) como base para su energía.

- ✓ ¿Qué tiene de peculiar la fermentación del succinato y del oxalato?
- ✓ Un producto común de las fermentaciones indicadas en las Tablas 17.7 y 17.8 es un ácido graso, como por ejemplo el acetato. ¿Por qué es importante desde el punto de vista energético?

17.21 Sintrofia

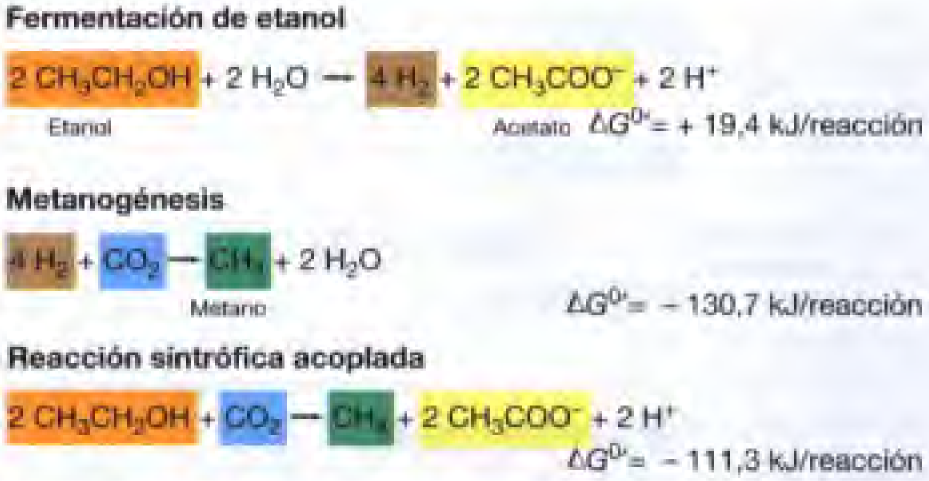
En microbiología son numerosos los ejemplos de *sintrofia*, una situación en la que dos organismos diferentes pueden degradar juntos algunas sustancias —y conservar la energía al hacerlo— que por separado no realizarían nunca. Veremos en la Sección 19.10 la importancia extrema de la sintrofia en el catabolismo anaeróbico que lleva a la producción de CH_4. En esta sección, trataremos la microbiología y los aspectos energéticos de la sintrofia.

Consumo de hidrógeno en las reacciones sintróficas

En la mayoría de los casos, en la reacción sintrófica interviene el hidrógeno gaseoso (H_2), que es producido por un miembro de la relación sintrófica y consumido por el otro. Por este motivo, la sintrofia es conocida también como *transferencia interespecífica de H_2*. El organismo que consume el H_2 puede ser cualquiera de entre algunos que ya hemos considerado, desnitrificantes, bacterias sulfato reductoras, homoacetógenos y metanógenos. Tomemos el caso de sintrofia en la fermentación de etanol y acetato y la posterior producción de metano (Figura 17.53). Como hemos visto, la fermentación de etanol lleva a cabo una reacción que tiene un cambio de energía libre estándar desfavorable (es decir, positiva). Sin embargo, el H_2 producido por el fermentador de etanol es un valioso donador de electrones para un metanógeno (Figura 17.53). Cuando se suman las dos reacciones, la reacción global es exergónica (Figura 17.53) y permite el crecimiento de ambos miembros de la mezcla sintrófica. Otro buen ejemplo de la sintrofia es la oxidación del butirato a acetato más H_2 por el sintrofo oxidador de ácidos grasos *Syntrophomonas* (Figura 17.54):

$$\text{Butirato}^- + 2\,H_2O \rightarrow 2\,\text{acetato}^- + H^+ + 2\,H_2 \qquad \Delta G^{0\prime} = +48{,}2\ \text{kJ}$$

El cambio de energía libre de esta reacción es muy desfavorable, y en cultivos axénicos *Syntrophomonas* no crece en butirato. Pero si el H_2 que se produce en la reacción es consumido inmediatamente por un organismo asociado (por ejemplo, un metanógeno), *Syntrophomonas* crece exuberantemente en cocultivo con el consumidor de H_2. Cabe preguntarse cómo pueden mantener el crecimiento de un organismo las reacciones químicas cuyos cambios de energía libre son positivos.



Fermentación de etanol

$2\,CH_3CH_2OH + 2\,H_2O \rightarrow 4\,H_2 + 2\,CH_3COO^- + 2\,H^+$

$\Delta G^{0\prime} = +19{,}4$ kJ/reacción

Metanogénesis

$4\,H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2\,H_2O$

$\Delta G^{0\prime} = -130{,}7$ kJ/reacción

Reacción sintrófica acoplada

$2\,CH_3CH_2OH + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2\,CH_3COO^- + 2\,H^+$

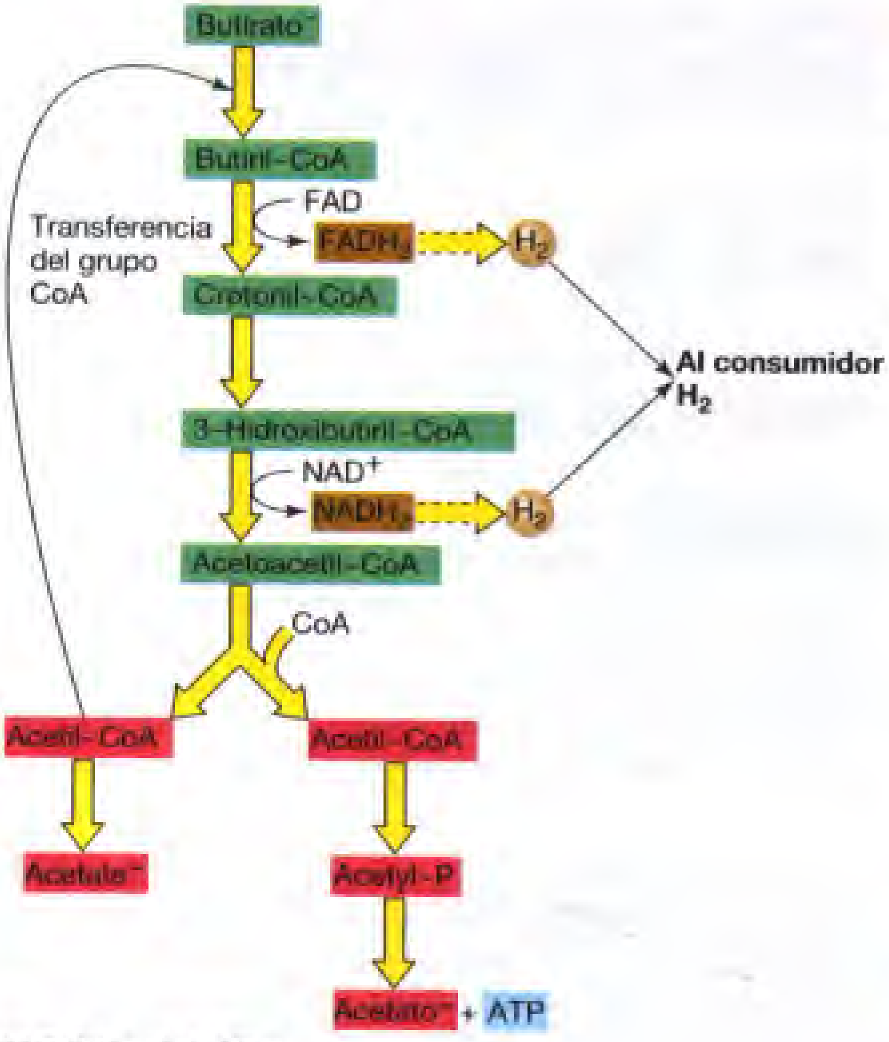
$\Delta G^{0\prime} = -111{,}3$ kJ/reacción

Figura 17.53 Fermentación de etanol a metano y acetato por la asociación sintrófica de una bacteria oxidadora de etanol y una bacteria asociada consumidora de H_2, en este caso, un metanógeno. Nótese que aunque la oxidación de etanol a acetato más H_2 es desfavorable en términos energéticos, la reacción se hace favorable cuando se acopla al consumo de H_2 por metanógenos. De este modo, los dos organismos comparten la energía liberada en la reacción acoplada.

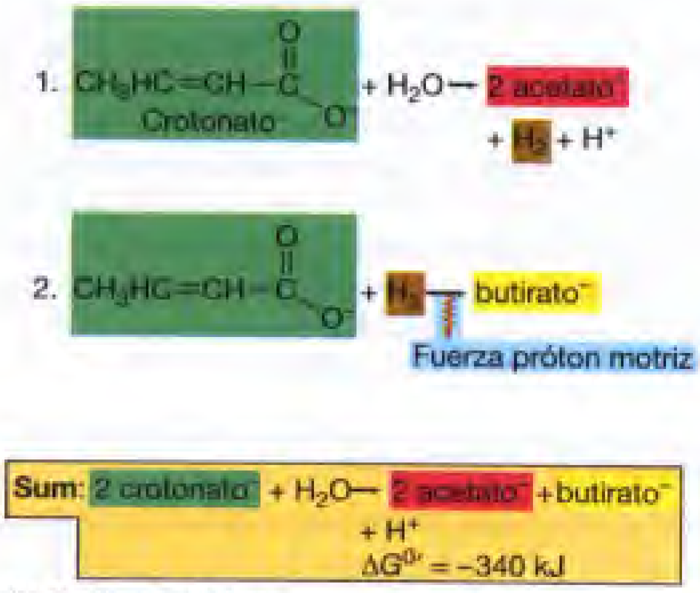
Energética de la sintrofia

Si el crecimiento de los organismos sintróficos se produce sólo cuando un organismo asociado elimina el H_2, la eliminación por sí misma tiene forzosamente que afectar a la energética de la reacción. ¿Cómo sucede esto? Una breve revisión de los principios de energía libre que aparecen en el Apéndice 1 indica que la concentración *real* de reactantes y productos en una reacción determinada puede cambiar radicalmente la energética. Esto es así porque $\Delta G^{0\prime}$ se calcula sobre la base de condiciones *estándar* —concentración 1 molar de productos y reactantes— mientras que el término relacionado ΔG se calcula basándose en las concentraciones reales de productos y reactantes presentes. En hábitat anóxicos, los productos de la oxidación de los áci-

Figura 17.54 Energética del crecimiento de *Syntrophomonas wolfei* en cultivos sintróficos (a) y en cultivos axénicos (b). En los cultivos sintróficos, el crecimiento depende de la presencia de un organismo que consuma H_2, tal como un metanógeno. Probablemente, la producción de H_2 implica un flujo inverso de electrones impulsado por una fuerza protón motriz, dado que el E_0' de FAD/$FADH_2$ o NAD^+/NADH es más electropositivo que el de 2 H^+/H_2 (*véase* Figura 5.9). En cultivos axénicos, la producción de energía está ligada a la reducción de crotonato a butirato.



(a) **Cultivo sintrófico**


1. CH3HC=CH–C(=O)O⁻ Crotonato + H2O → 2 acetato⁻ + H2 + H+
2. CH3HC=CH–C(=O)O⁻ + H2 → butirato⁻
Fuerza prótón motriz
Sum: 2 crotonato⁻ + H2O → 2 acetato⁻ + butirato⁻ + H+
ΔG0' = −340 kJ

(b) **Cultivo axénico**

dos grasos, especialmente el H_2 (porque se trata de un potente donador de electrones para las respiraciones anaeróbicas), se consumen inmediatamente, y esto mantiene las concentraciones de H_2 extremadamente bajas, por lo general inferiores a 10^{-4} atm (*véase* Tabla 19.4). De esta forma, si la concentración de H_2 es muy baja y se emplea ΔG para el cálculo de la energía de la reacción (*véase* Apéndice 1 para el cálculo ΔG), el cambio de energía libre asociado a la oxidación de etanol o ácidos grasos a acetato más H_2 resulta exergónico, lo que indica que hay liberación de energía. Por ejemplo, si la concentración de H_2 se mantiene extremadamente baja por las actividades del organismo asociado que consume H_2, la oxidación de butirato por *Syntrophomonas* produce alrededor de −18 kJ.

En el mecanismo de producción de ATP por sintrofos interviene tanto la fosforilación a nivel de sustrato como la oxidativa, dependiendo del sistema de crecimiento de los organismos. La fosforilación a nivel de sustrato puede tener lugar durante la conversión de acetil-CoA (generada por la β-oxidación del etanol o del ácido graso) a acetato (Figura 17.54*a*) y puede que sea el *único* modo en el que se produce ATP en condiciones sintróficas. Sin embargo, *Syntrophomonas* puede llevar a cabo una respiración anaeróbica porque puede crecer en cultivo axénico con determinados ácidos grasos insaturados. El crotonato, por ejemplo, permite el crecimiento de *Syntrophomonas*, siendo algunas moléculas de crotonato oxidadas a acetato y otras reducidas a butirato (Figura 17.54*b*). Es posible que la reducción del crotonato por *Syntrophomonas* esté acoplada a la formación de una fuerza protón motriz y a la síntesis de ATP, como en otros tipos de respiración anaeróbica que emplean aceptores orgánicos de electrones; por ejemplo, la reducción de fumarato a succinato (*véase* Sección 17.18).

Independientemente de la forma en que se obtiene ATP en situación de sintrofia, hay anomalías energéticas adicionales para *Syntrophomonas* en este modo de crecimiento, ya que está obligado a producir H_2 a partir de donadores de electrones más electropositivos, tales como $FADH_2$ y $NADH_2$ (Figura 17.54*a*). Esto indica que parte del ATP producido podría ser necesario para dirigir las reacciones del flujo inverso de electrones (*véase* Sección 17.5) para producir H_2. Está claro que, desde una perspectiva energética, las bacterias sintróficas oxidadoras de ácidos grasos y alcoholes están en el límite de vida posible.

Las bacterias sintróficas han desarrollado sistemas eficientes que les permiten utilizar productos de la fermentación altamente reducidos originados por fermentadores primarios y cooperar con otros anaerobios, proporcionándoles el sustrato necesario. Por el contrario, para los organismos *aerobios* la sintrofia no es una opción porque, con el O_2 como aceptor de electrones, la energética de la reacción es mucho más favorable que para el catabolismo fermentativo del mismo sustrato. Por tanto, las relaciones sintróficas son características de las transformaciones anaeróbicas, en las que la energía disponible es muy pequeña y los organismos están altamente especializados para explotar energéticamente las reacciones marginales.

✓ 17.21 Revisión de conceptos

En la sintrofia, dos organismos degradan juntos compuestos que ninguno de ellos podría degradar por separado. Por lo general, en el proceso uno de los organismos produce H_2 y el otro lo consume. El consumo de H_2 afecta a la energética de la reacción que lleva a cabo el productor de H_2, permitiéndole una producción de ATP que de otro modo no sería posible.

- ✓ Proporciónese un ejemplo de sintrofia. ¿Por qué se dice que en este ejemplo ambos organismos salen beneficiados?
- ✓ Indíquese cómo se fabrica ATP durante la degradación sintrófica de etanol que muestra la Figura 17.53.
- ✓ ¿Puede crecer en cultivo axénico un organismo sintrófico oxidador de ácidos grasos? Póngase un ejemplo describiendo la forma en la que el organismo fabrica ATP en estas condiciones.

IV OXIDACIÓN DE HIDROCARBUROS Y PAPEL DEL O_2 EN EL CATABOLISMO DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS

Los hidrocarburos son abundantes en la Tierra y constituyen un sustrato excelente para diversos quimioorganotrofos. Su degradación aeróbica, sin embargo, presenta especiales problemas bioquímicos que se tratarán en este capítulo. También consideraremos brevemente la degradación aeróbica de sustancias como polisacáridos, grasas, y algunas otras, como ejemplos de la diversidad metabólica de los microorganismos.

17.22 El oxígeno molecular (O_2) como reactante en procesos bioquímicos

En la Sección 5.11 hemos tratado la función del O_2 como aceptor de electrones en reacciones que generan energía. Aunque éste es su papel más importante en el metabolismo celular, la actividad del O_2 como *reactante directo* en algunos procesos anabólicos y catabólicos reviste interés e importancia.

Oxigenasas

Las **oxigeneasas** son enzimas que catalizan la incorporación de oxígeno a partir del O_2 en compuestos orgánicos. Hay dos clases de oxigenasas: *dioxigenasas*, que catalizan la incorporación en la molécula de *ambos* átomos del O_2, y *monooxigenasas*, que catalizan la transferencia a un compuesto orgánico de *sólo uno* de los dos átomos del O_2 como un grupo hidroxilo (OH), mientras el segundo átomo de O_2 es reducido a agua, H_2O. Como las monooxigenasas catalizan la formación de grupos hidroxilo (OH) en los compuestos orgánicos, a veces reciben el nombre de *hidroxilasas*. En la mayor parte de las monooxigenasas el donador de electrones es NADH o NADPH, aunque el acoplamiento directo de O_2 se hace mediante una flavina que es reducida por el donador NADH o NADPH. En el caso de la amoníaco monooxigenasa, previamente discutido (*véase* Sección 17.12), el donador de electrones es el citocromo *c*.

En los organismos vivos, diversos tipos de reacciones requieren O_2 como reactante. Uno de los mejores ejemplos es la participación del O_2 en la biosíntesis de esterol. La formación del sistema de anillos fusionados del esterol (*véase* Figura 4.18) necesita oxígeno molecular. Ciertamente, tal reacción no tiene lugar en condiciones anóxicas, de modo que los organismos que crecen anaeróbicamente deben prescindir de esta reacción u obtener la sustancia necesaria (esterol) preformada del ambiente. El requerimiento de O_2 como reactante en la biosíntesis tiene un notable significado evolutivo, ya que el O_2 molecular estaba ausente de la atmósfera terrestre en las primeras etapas de la vida, y apareció solamente con las cianobacterias, primeros organismos fototrofos capaces de producir O_2 (*véase* Capítulo 11). El papel del O_2 en la utilización de los hidrocarburos se discute a continuación.

✓ 17.22 Revisión de conceptos

Además de su papel como aceptor de electrones, el oxígeno (O_2) es también un reactante en algunos procesos bioquímicos. Las enzimas denominadas oxigenasas introducen O_2 en un compuesto bioquímico.

- ✓ En cuanto a la función, ¿cuál es la diferencia entre las *monooxigenasas* y las *dioxigenasas*?

17.23 Oxidación de hidrocarburos

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos que sólo contienen carbono e hidrógeno y resultan muy insolubles en agua. Los de bajo peso molecular son gases, mientras que los de peso molecular más alto son líquidos o sólidos a temperatura ambiente. Algunos hidrocarburos son *compuestos alifáticos*, en los que los átomos de carbono están unidos en cadenas abiertas. Hay una enorme variación entre los hidrocarburos alifáticos en lo que respecta a longitud de cadena, grado de ramificación y número de dobles enlaces. Otro grupo importante de hidrocarburos contiene el anillo aromático y pueden ser considerados como derivados del benceno. Aunque algunas bacterias anaerobias degradan hidrocarburos (*véase* Sección 19.18), en esta sección nos centraremos en su degradación *aeróbica*.

Hidrocarburos alifáticos

Diversas bacterias, e incluso mohos y levaduras, pueden utilizar hidrocarburos para su crecimiento en condiciones aeróbicas. El paso inicial en la oxidación de hidrocarburos alifáticos saturados tiene como reactante el oxígeno molecular (O_2), uno de cuyos átomos se incorpora en el hidrocarburo oxidado. Esta reacción la lleva a cabo una monooxigenasa (*véase* Sección 17.22), y la secuencia típica de reacciones se muestra en la Figura 17.55. El producto final es acetil-CoA. Sin embargo, no en todos los casos la oxidación inicial se produce en el carbono terminal. A veces puede producirse en el segundo carbono y entonces las reacciones posteriores son muy diferentes. Los hidrocarburos alifáticos *insaturados* que contienen un doble enlace terminal no son refractarios a la descomposición anóxica y pueden ser oxidados por algunas bacterias sulfato reductoras y otras bacterias anaeróbicas.

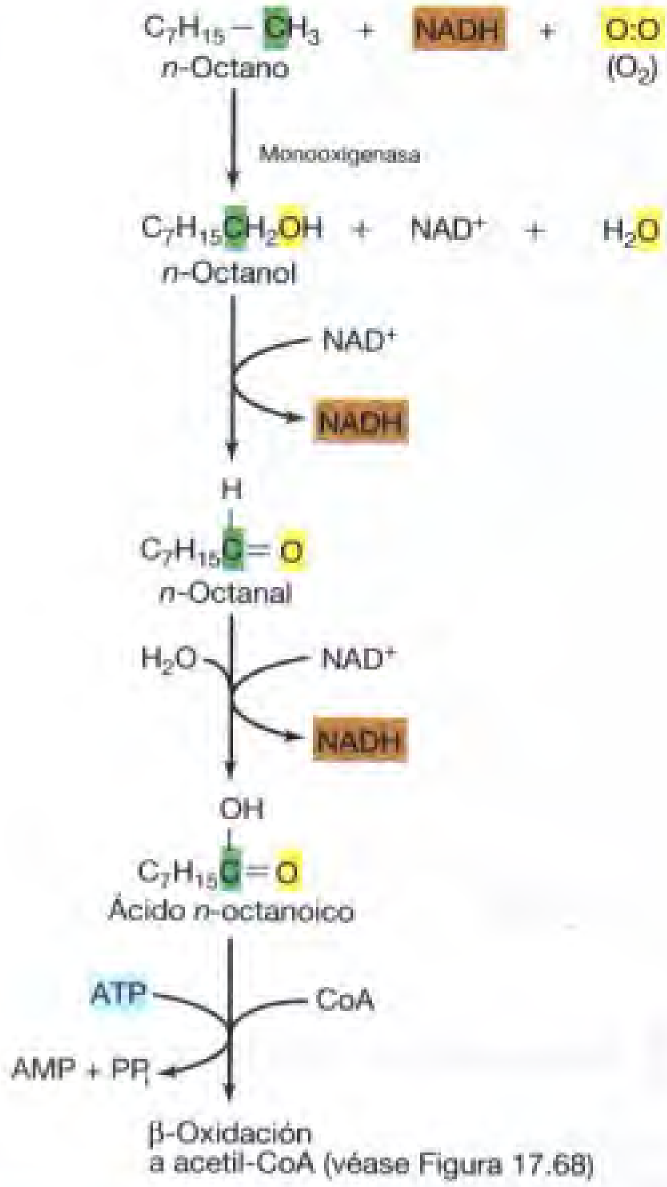


Figura 17.55 Pasos en la oxidación de un hidrocarburo alifático, el primero de los cuales está catalizado por una monooxigenasa.

Hidrocarburos aromáticos

Muchos hidrocarburos aromáticos son utilizados de forma aeróbica como donadores de electrones por microorganismos, de entre los cuales las bacterias del género *Pseudomonas* son las más estudiadas. El metabolismo de estos compuestos, algunos de los cuales son moléculas grandes, suele iniciarse con la formación, o bien de *protocatecuato* o *catecol*, o bien de un compuesto relacionado estructuralmente, como se indica en la Figura 17.56*a*.

Estos compuestos de un solo anillo se conocen como *sustratos de partida*, porque el catabolismo oxidativo sólo continúa después de que las moléculas aromáticas complejas se han convertido a estas formas más simples. El protocatecuato y el catecol pueden ser degradados después a compuestos que entran en el ciclo del ácido cítrico: succinato, acetil-CoA y piruvato (Figura 5.22). Varios pasos en el catabolismo de los hidrocarburos aromáticos suelen requerir oxigenasas. Las Figuras 17.56*b*, *c* y *d* muestran tres reacciones diferentes catalizadas por oxigenasas, una que usa una monooxigenasa y dos que usan dioxigenasas.

Degradación anaeróbica de compuestos aromáticos

Los compuestos aromáticos también se pueden degradar anaeróbicamente por la acción de bacterias aeróbicas si el compuesto ya dispone de un átomo de oxígeno, como en el caso del fenol. Estos compuestos fenólicos son degradados por algunas bacterias desnitrificantes, fototróficas, reductoras de hierro y sulfato reductoras. Desde el punto de vista bioquímico, el catabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos procede por escisión *reductiva* más que oxidativa del anillo (Figura 17.57). Hay, por tanto, una *reducción del anillo* seguida de su *rotura*, dando un ácido graso o ácido dicarboxílico de cadena recta. Estos intermediarios pueden convertirse en acetil-CoA y utilizarse con fines biosintéticos o de producción de energía. El benzoato y sus derivados son productos naturales comunes que se degradan fácilmente de forma anaeróbica.

Se han obtenido también resultados experimentales que corroboran la degradación anaeróbica del benceno y del tolueno, compuestos aromáticos que carecen de un átomo de oxígeno (*véase* Figura 17.56 para las estructuras). El catabolismo del benceno es llevado a cabo por algunas bacterias desnitrificantes y reductoras del hierro férrico. En términos bioquímicos, el tolueno se convierte en el derivado del benzoato benzoil-CoA, que supuestamente puede catabolizarse luego por reducción del anillo, como se muestra en la Figura 17.57.

✓ 17.23 Revisión de conceptos

Muchos microorganismos degradan hidrocarburos alifáticos y aromáticos. El catabolismo aeróbico requiere la acción de coenzimas oxigenasas. La degradación anaeróbica de hidrocarburos aromáticos se produce por vías reductoras en vez de oxidativas.

- ✓ Dibújese la estructura química del benceno y del benzoato. ¿Son compuestos alifáticos o aromáticos?
- ✓ ¿Cuál es la diferencia fundamental cuando se compara la degradación *anaeróbica* de un compuesto aromático y su metabolismo *aeróbico*? Dese un ejemplo.

17.24 Metanotrofia y metilotrofia

En la Sección 12.6 se ha considerado la situación exclusiva, en relación con el metabolismo del carbono, de los metanotrofos y los metilotrofos. Estos organismos, aunque no son autotrofos, usan compuestos C_1 para el metabolismo energético y la biosíntesis. Ahora nos centraremos en estos dos procesos de metanotrofia, que es la utilización de metano (CH_4, el más sencillo de todos los hidrocarburos) como donador de electrones y fuente de carbono, a título de ejemplo fundamental.

Bioquímica de la oxidación de metano

Los pasos individuales en la oxidación de metano a CO_2 se pueden resumir como sigue:

$$CH_4 \; (\; CH_3OH \rightarrow \mathbf{CH_2O} \rightarrow HCOO^- \rightarrow CO_2$$

Es interesante advertir que los metanotrofos asimilan todo o la mitad de su carbono (dependiendo del organismo) en el nivel de formaldehído (aparece señalado en negrita en

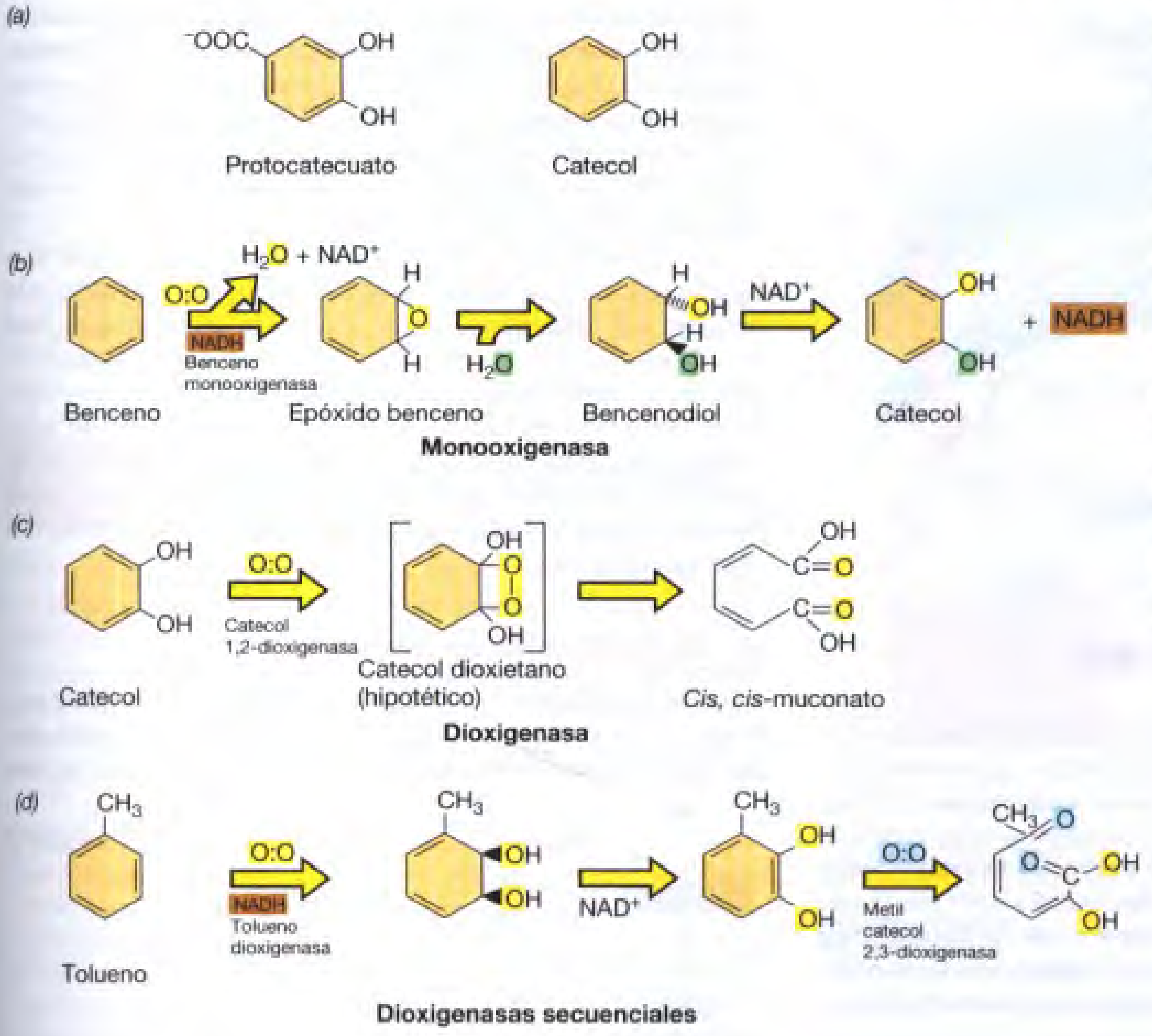

(a)
⁻OOC
OH
OH
Protocatecuato
OH
OH
Catecol
(b)
H₂O + NAD⁺
O:O
NADH
Benceno monooxigenasa
H
O
H
H₂O
H
OH
H
OH
NAD⁺
OH
OH
+ NADH
Benceno
Epóxido benceno
Bencenodiol
Catecol
Monooxigenasa
(c)
OH
OH
O:O
Catecol 1,2-dioxigenasa
OH
O
O
OH
OH
C=O
C=O
OH
Catecol
Catecol dioxietano (hipotético)
Cis, cis-muconato
Dioxigenasa
(d)
CH₃
O:O
NADH
Tolueno dioxigenasa
CH₃
OH
OH
NAD⁺
CH₃
OH
OH
O:O
Metil catecol 2,3-dioxigenasa
CH₃
O
O
C
OH
OH
Tolueno
Dioxigenasas secuenciales

Figura 17.56 Funciones de las oxigenasas en el catabolismo de compuestos aromáticos. (a) Protocatecuato y catecol, dos productos comunes de oxidación de compuestos aromáticos. (b) Hidroxilación del benceno a catecol por una monooxigenasa, donde el NADH es el donador de electrones. (c) Rotura del catecol a *cis*, *cis*-muconato por una dioxigenasa. Los átomos de oxígeno reaccionantes se destacan en color en ambas reacciones para mostrar los diferentes mecanismos. (d) Actividad de la tolueno dioxigenasa y la metil catecol 2,3-dioxigenasa en la degradación del tolueno. Los átomos de oxígeno que introduce cada enzima se distinguen con colores diferentes.

la reacción anterior), y podemos ver que esto produce un mayor ahorro de energía si se compara con los organismos autotrofos, en los que el carbono se asimila a partir del CO_2, que está más oxidado. Pero ahora, nos vamos a centrar en la conservación de la energía.

En la fase inicial de la oxidación de metano interviene la enzima **metano monooxigenasa**. Como se ha indicado en la Sección 17.22, las enzimas oxigenasas catalizan la incorporación de oxígeno a partir del O_2 en compuestos de carbono (y algunos compuestos de nitrógeno), y parece que participan considerablemente en el metabolismo de los hidrocarburos. Las monooxigenasas incorporan un átomo del O_2 en el sustrato, mientras que el segundo átomo se reduce a H_2O. En el metanotrofo *Methylosinus*, en el que se ha estudiado el proceso en profundidad, los electrones necesarios para la oxidación de CH_4 a CH_3OH proceden del citocromo *c* (Figura 17.58). La exigencia de poder reductor en la primera fase excluye la síntesis de ATP durante la oxidación de metano a metanol, lo que es congruente con la productividad del crecimiento (gramos de células producidas por mol de sustrato consumido) de los metanotrofos, que son los mismos tanto si se usa metano o metanol como sustrato. Las otras fases de la oxidación de CH_3OH a CO_2 suministran electrones a la cadena de transporte de electrones y, de éstos, del transporte de electrones resultante y de la fuerza protón motriz generada, se produce ATP (Figura 17.58).

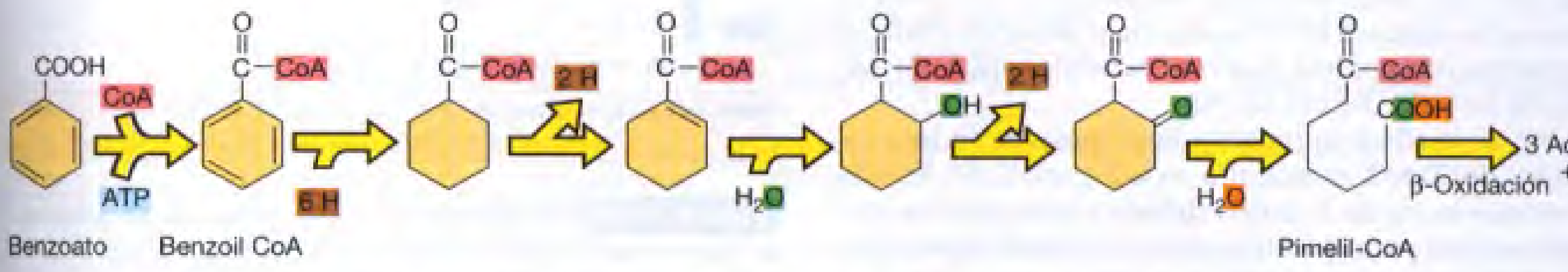

COOH
CoA
ATP
O
C–CoA
6 H
O
C–CoA
2 H
O
C–CoA
H₂O
O
C–CoA
OH
2 H
O
C–CoA
O
H₂O
O
C–CoA
COOH
3 Acetato + CO₂
β-Oxidación
Benzoato
Benzoil CoA
Pimelil-CoA

Figura 17.57 Degradación anóxica de benzoato por rotura reductora del anillo. Obsérvese que todos los intermediarios de la vía están unidos a la coenzima A. El acetato producido es catabolizado después en el ciclo del ácido cítrico (*véase* Sección 5.13).

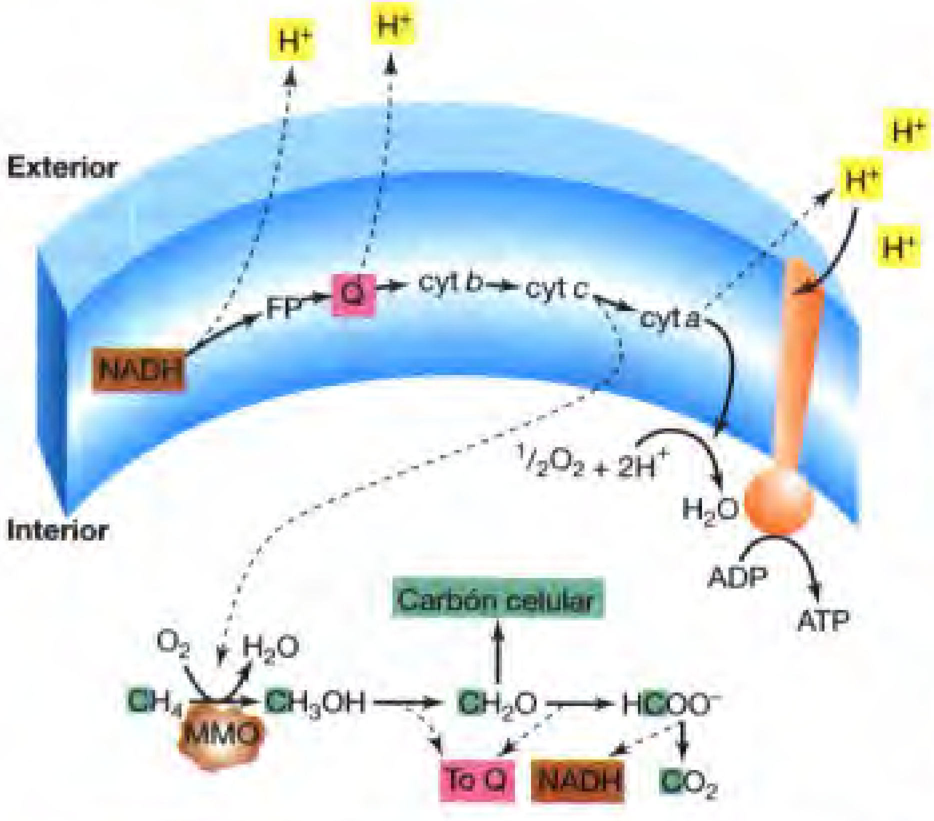

H⁺
H⁺
H⁺
H⁺
H⁺
Exterior
Interior
NADH
FP
Q
cyt b
cyt c
cyt a
$^1/_2O_2 + 2H^+$
H_2O
ADP
ATP
Carbón celular
O_2
H_2O
CH_4
MMO
CH_3OH
CH_2O
$HCOO^-$
To Q
NADH
CO_2

Figura 17.58 Oxidación de metano por bacterias metanotrofas. El metano (CH_4) se convierte en metanol (CH_3OH) por la acción de la enzima *metano monooxigenasa*. Los electrones necesarios para este primer paso proceden del citocromo *c* y no se conserva ninguna energía en esta reacción. A partir de un flujo de electrones, se establece una fuerza protón motriz en la membrana, y ésta impulsa la ATPasa. El carbono para la biosíntesis procede principalmente del formaldehído (CH_2O). MMO, Metano monooxigenasa; cyt, citocromo y Q, quinona. Aunque no indicada como tal, MMO es realmente una enzima asociada a membrana.

Asimilación de C_1 en el material celular

Como se indicó en la Sección 12.6, se conocen dos clases de metanotrofos, el *Tipo I* y el *Tipo II*. Los miembros de cada clase comparten una serie de propiedades y cada uno muestra un mecanismo distinto de asimilación de C_1; éstos son la **vía de la ribulosa monofosfato** (Tipo I) y la **vía de la serina** (Tipo II).

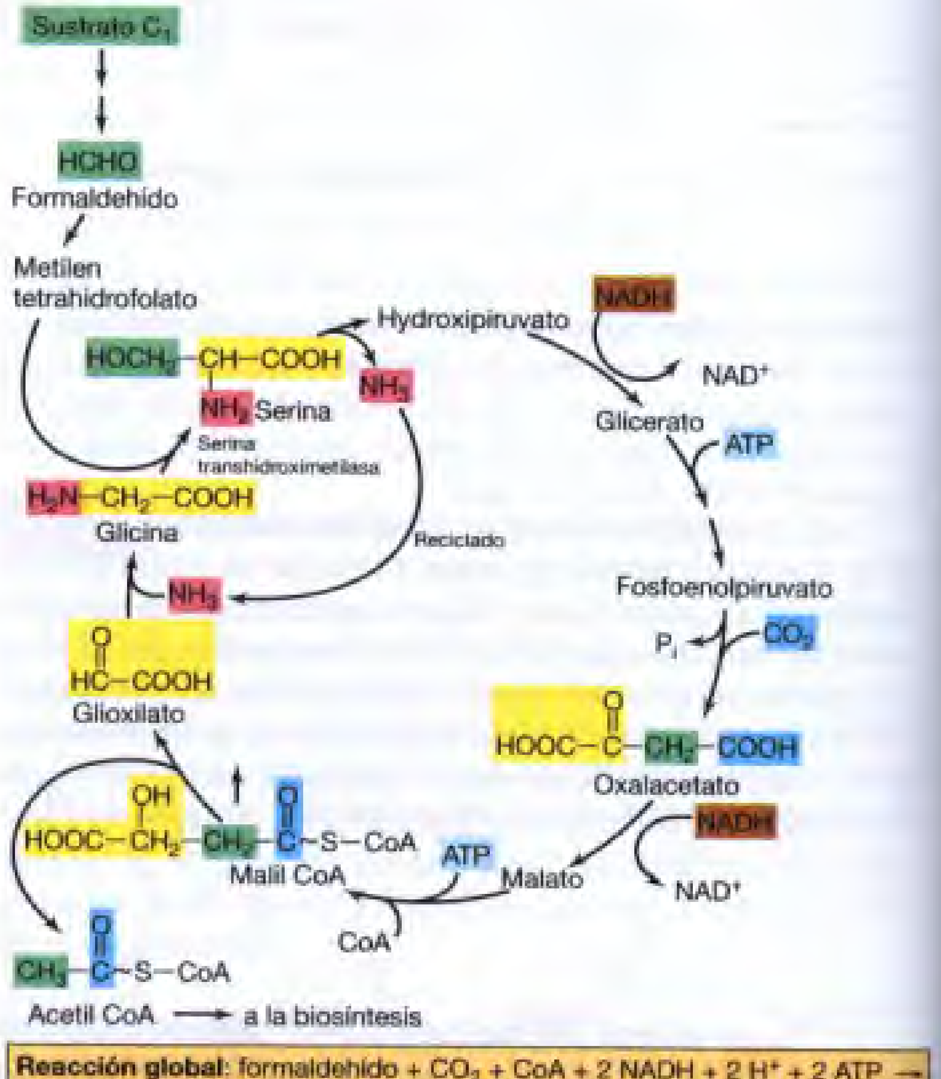
La vía de la serina se muestra en la Figura 17.59. En esta vía metabólica, se sintetiza una unidad de dos átomos de carbono, el acetil-CoA, a partir de una molécula de formaldehído (producido por la oxidación de CH_4, *véase* Figura 17.58) y una molécula de CO_2. La vía requiere poder reductor y energía en forma de dos moléculas de NADH y dos de ATP por cada acetil-CoA sintetizado. La vía de la serina emplea algunas enzimas del ciclo del ácido cítrico y por lo menos una enzima, la *serina transhidroximetilasa*, exclusiva de esta vía (Figura 17.59).

La vía de la ribulosa monofosfato, presente en los metanotrofos del Tipo I, se muestra en la Figura 17.60. Es más eficiente que la vía de la serina debido a que *todos* los átomos de carbono para la formación de material celular provienen del formaldehído. Dado que éste se encuentra en el mismo nivel oxidativo que el material celular, no se necesita poder reductor. La vía de la ribulosa monofosfato requiere la introducción de energía en forma de una molécula de ATP por cada molécula de gliceraldehído 3-fosfato sintetizada (Figura 17.60). En consonancia con el menor requerimiento energético de la vía de la ribulosa monofosfato, el rendimiento celular (gramos de célula producidos por mol de CH_4 oxidado) de los metanotrofos del Tipo I es más elevado que en el caso del Tipo II.

La enzima *hexulosafosfato sintasa*, que condensa una molécula de formaldehído con una de ribulosa 5-fosfato, y la *hexulosa 6-P isomerasa* (Figura 17.60) son exclusivas de esta vía, mientras que las enzimas restantes del ciclo participan en la reordenación de los azúcares en muchos organismos diferentes. Hay que destacar que el sustrato para la reacción inicial de esta vía, la ribulosa 5-P es casi idéntica que el aceptor C_1 del ciclo de Calvin (ribulosa 1,5-bisfosfato), lo cual indica que estos dos ciclos comparten raíces evolutivas.

✓ 17.24 Revisión de conceptos

La metanotrofia es el uso de CH_4 como fuente de energía y carbono. La enzima metano *monooxigenasa* es clave en el catabolismo del metano. En los metanotrofos, las unidades C_1 son


Sustrato C_1
HCHO
Formaldehído
Metilen tetrahidrofolato
$HOCH_2-CH-COOH$
NH_2 Serina
NH_3
Hydroxipiruvato
NADH
NAD⁺
Glicerato
ATP
Serina transhidroximetilasa
H_2N-CH_2-COOH
Glicina
Reciclado
NH_3
Fosfoenolpiruvato
P_i
CO_2
$HC(=O)-COOH$
Glioxilato
$HOOC-C(=O)-CH_2-COOH$
Oxalacetato
NADH
NAD⁺
$HOOC-CH(OH)-CH_2-CH_2-C(=O)-S-CoA$
Malil CoA
ATP
Malato
CoA
$CH_3-C(=O)-S-CoA$
Acetil CoA
a la biosíntesis

Reacción global: formaldehído + CO_2 + CoA + 2 NADH + 2 H^+ + 2 ATP → Acetil~CoA + 2 NAD^+ + 2 ADP + 2 P_i + 2 H_2O

Figura 17.59 Vía de la serina para la asimilación de unidades C_1 en material celular por bacterias metilotrofas Tipo II. El producto de la vía metabólica, el acetil-CoA, se utiliza como punto de partida para fabricar nuevo material celular. La enzima clave de la vía es la *serina transhidroximetilasa*.

asimiladas en el material celular en el nivel de formaldehído, ya sea por la vía de la ribulosa monofosfato o de la serina.

- ✓ ¿Cuáles son los requerimientos de energía y poder reductor en la vía de la ribulosa monofosfato? ¿Y en la vía de la serina? ¿Por qué son diferentes?
- ✓ ¿Por qué la oxidación de CH_4 a CH_3OH requiere poder reductor?
- ✓ ¿Cuál de las dos vías, la del ciclo de Calvin o la de la ribulosa monofosfato, requiere un suministro mayor de energía? ¿Por qué?

17.25 Utilización de hexosas, pentosas y polisacáridos

Para completar el estudio del metabolismo de los quimioorganotrofos, consideraremos ciertos aspectos del catabolismo de compuestos orgánicos, especialmente el uso de sustancias poliméricas que deben ser hidrolizadas a sus unidades monoméricas antes de que puedan ponerse en marcha los mecanismos de generación de energía. Empezaremos con la degradación microbiana de polisacáridos.

Utilización de hexosas y polisacáridos

Los azúcares con seis átomos de carbono, llamados *hexosas*, son los donadores de electrones más importantes para muchos quimioorganotrofos; también son componentes estructurales importantes de las paredes celulares, cápsulas, capas mucosas y compuestos de reserva de los microorganismos. Las fuentes más comunes de hexosas en la naturaleza, que se indican en la Tabla 17.9, son polisacáridos y algunos disacáridos. La *celulosa* y el *almidón* son los dos polisacáridos naturales de mayor importancia.

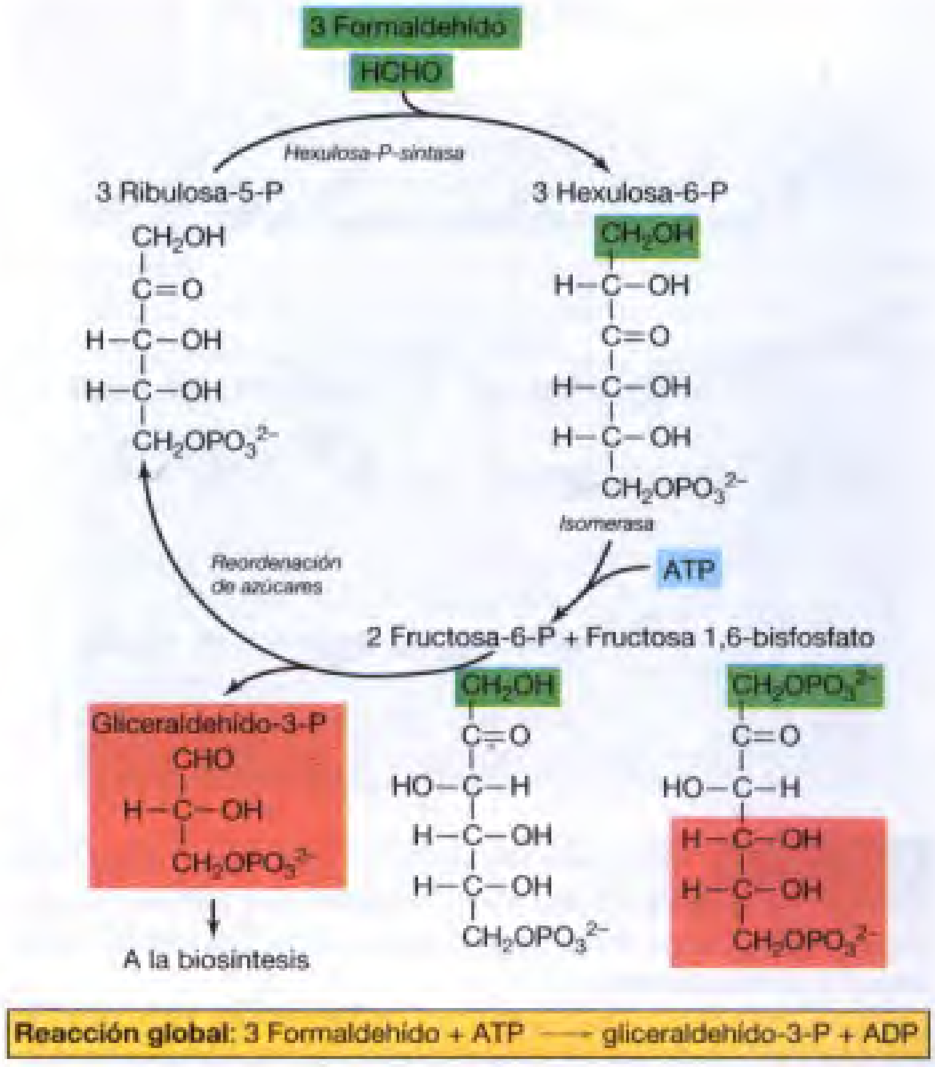

3 Formaldehído
HCHO
Hexulosa-P-sintasa
3 Ribulosa-5-P
CH₂OH
C=O
H–C–OH
H–C–OH
CH₂OPO₃²⁻
3 Hexulosa-6-P
CH₂OH
H–C–OH
C=O
H–C–OH
H–C–OH
CH₂OPO₃²⁻
Isomerasa
ATP
Reordenación de azúcares
2 Fructosa-6-P + Fructosa 1,6-bisfosfato
Gliceraldehído-3-P
CHO
H–C–OH
CH₂OPO₃²⁻
A la biosíntesis
CH₂OH
C=O
HO–C–H
H–C–OH
H–C–OH
CH₂OPO₃²⁻
CH₂OPO₃²⁻
C=O
HO–C–H
H–C–OH
H–C–OH
CH₂OPO₃²⁻
Reacción global: 3 Formaldehído + ATP ⟶ gliceraldehído-3-P + ADP

Figura 17.60 Vía de la ribulosa monofosfato para la asimilación de compuestos de un carbono, tal como ocurre en las bacterias metilotrofas de Tipo I. El nombre completo del azúcar hexulosa es D-eritro-L-glicero-3-hexulosa 6-fosfato. Son necesarios tres formaldehídos para completar el ciclo, con un resultado neto de una molécula de gliceraldehído 3-P. La enzima clave de esta vía es es la *hexulosa P-sintasa.*

TABLA 17.9 Polisacáridos naturales que producen hexosas y pentosasa[a]

Sustancia	Composición	Fuentes	Enzimas catabólicas
Celulosa	Polímero de glucosa (β-1,4-)	Plantas (hojas, tallos)	Celulasas (β,1-4-glucanasas)
Almidón	Polímero de glucosa (α-1,4-)	Plantas (hojas, semillas)	Amilasa
Glucógeno	Polímero de glucosa (α-1,4- y α-1,6-)	Animales (músculo)	Amilasa, fosforilasa
Laminarina	Polímero de glucosa (β-1,3-)	Algas marinas (Feofitas)	β-1,3-Glucanasa (laminarinasa)
Paramilón	Polímero de glucosa (β-1,3-)	Algas (Euglenofitas y Xantofitas)	β-1,3-Glucanasa
Agar	Polímero de galactosa y ácido galacturónico	Algas marinas (Rodofitas)	Agarasa
Quitina	Polímero de *N*-acetilglucosamina (β-1,4-)	Hongos (paredes celulares) Insectos (exoesqueletos)	Quitinasa
Pectina	Polímero de ácido galacturónico (de la galactosa)	Plantas (hojas, semillas)	Pectinasa (poligalacturonasa)
Dextrano	Polímero de glucosa	Cápsulas o capas mucosas bacterianas	Dextranasa
Xilano	Heteropolímero de xilosa y otros azúcares (β-1,4- y grupos laterales α-1,2 o α-1,3)	Plantas	Xilanasas
Sacarosa	Disacárido glucosa-fructosa	Plantas (frutos, hortalizas)	Invertasa
Lactosa	Disacárido glucosa-galactosa	Leche	β-Galactosidasa

[a] Cada uno de estos azúcares puede ser degradado por microorganismos.

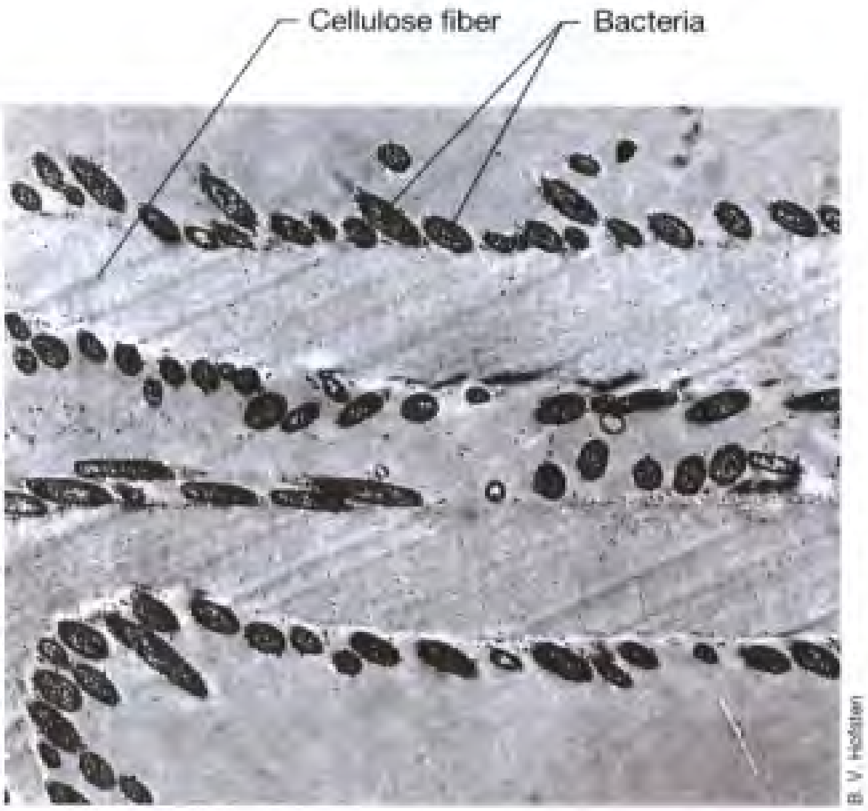


Figura 17.61 Micrografía electrónica de transmisión mostrando la adhesión de *Sporocytophaga myxococcoides*, una bacteria que degrada celulosa, a las fibras de este polisacárido. Las células tienen unos 0,5 µm de diámetro.

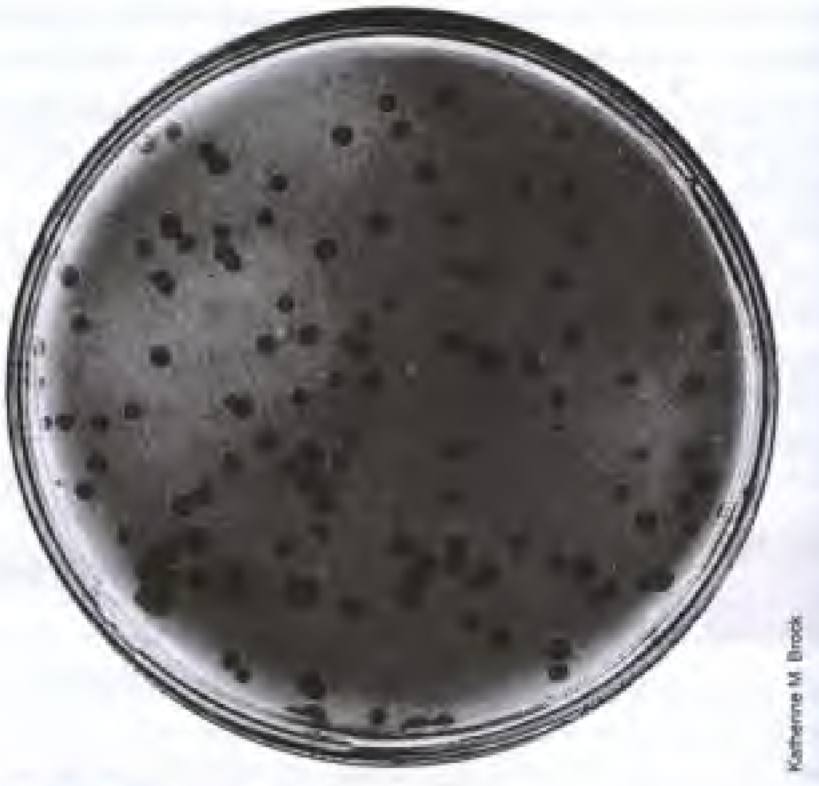


Figura 17.62 Colonias de *Cytophaga hutchinsonii* en una placa de agarosa. Las áreas claras indican las zonas donde ha sido digerida la celulosa.

Aunque tanto el almidón como la celulosa se componen de unidades de glucosa, su estructura es diferente (Tabla 17.9, *véase* también Figura 3.6) y esto afecta profundamente a sus propiedades. La celulosa es mucho más insoluble que el almidón y, por lo general, se digiere más lentamente. La celulosa forma largas fibrillas y los organismos capaces de digerirla aparecen con frecuencia estrechamente asociados a ellas (Figura 17.61). Muchos hongos pueden digerir celulosa y son los principales responsables de la descomposición de materiales vegetales en el suelo de los bosques. Entre las bacterias, sin embargo, son relativamente pocos los grupos que digieren la celulosa. Entre ellos están las bacterias deslizantes *Sporocytophaga* y *Citophaga* (Figuras 17.61 y 17.62; *véase* también Figura 12.90), los clostridios y los actinomicetos son los más corrientes. La digestión anóxica de la celulosa la llevan a cabo algunas especies de *Clostridium*, que son frecuentes en los sedimentos lacustres, en el tracto intestinal de animales y en los sistemas de digestión anaeróbica de aguas residuales. La digestión de la celulosa es también un proceso importante en el rumen de los rumiantes, donde las especies *Fibrobacter* y *Ruminococcus* degradan activamente la celulosa (*véase* Sección 19.11).

Muchos hongos y bacterias digieren el almidón en cultivos de laboratorio, como se ilustra en la Figura 17.63. Las enzimas que hidrolizan el almidón, llamadas *amilasas*, son de considerable utilidad en industrias donde debe digerirse almidón, tales como en la industria textil, en lavanderías, y en las industrias papelera y alimentaria. Los hongos y las bacterias son las fuentes comerciales de estas enzimas (*véase* Sección 30.9).

Todos los polisacáridos extracelulares utilizados como sustratos se descomponen por hidrólisis en sus unidades monoméricas. En cambio, los polisacáridos formados dentro de las células como productos de reserva no se rompen por hidrólisis sino por **fosforólisis**. Este proceso, que comprende la adición de fosfato inorgánico y forma hexosa fosfato en vez de hexosa libre, puede resumirse de la forma siguiente para la degradación del almidón, que es un polímero α–1,4 glucosa:

$$(C_6H_{12}O_6)_n + P_i \rightarrow (C_6H_{12}O_6)_{n-1} + \text{glucosa 1-fosfato)}$$

Como la glucosa 1-fosfato se puede convertir fácilmente en glucosa 6-fosfato, un intermediario clave en la glicó-

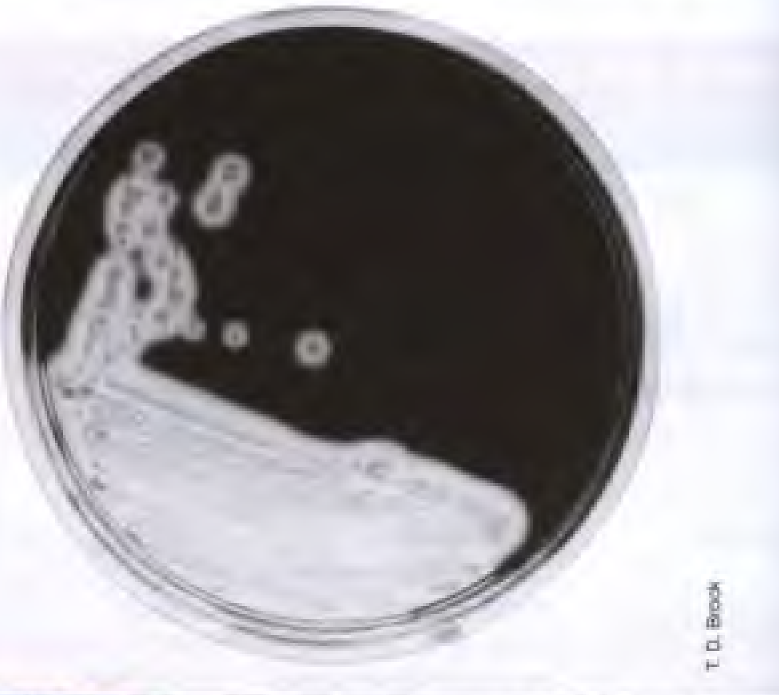


Figura 17.63 Demostración de la hidrólisis del almidón por colonias de *Bacillus subtilis*. Tras la incubación, la placa se cubrió con una solución yodada de Lugol. Donde hay hidrólisis del almidón desaparece el color violeta característico del complejo yodo-almidón. La hidrólisis del almidón alcanza cierta distancia de las colonias bacterianas debido a la producción de amilasa extracelular que difunde en el medio.

lisis (*véase* Figura 5.14), sin que necesite ATP para esta conversión, la fosforólisis representa un ahorro neto para la célula.

Disacáridos

Muchos microorganismos pueden usar *disacáridos* para crecer (Tabla 17.9). La utilización microbiana de *lactosa* es de considerable importancia económica, ya que los microorganismos que acidifican la leche producen ácido láctico a partir de la lactosa. La *sacarosa*, el disacárido más común de las plantas superiores, se hidroliza primero a sus monosacáridos componentes (glucosa y fructosa) por la enzima *invertasa*, y éstos se metabolizan entonces por las vías normales. La *celobiosa*, una β-1,4-diglucosa y producto mayoritario de la digestión de la celulosa, también la utilizan muchas bacterias que no pueden degradar el polímero de celulosa como tal.

El *dextrano*, un polisacárido microbiano, lo sintetizan algunas bacterias mediante la enzima *dextransacarosa*, utilizando sacarosa como material inicial:

$$n\ \text{sacarosa} \rightarrow \underset{\text{dextrano}}{(\text{glucosa})_n} + n\ \text{fructosa}$$

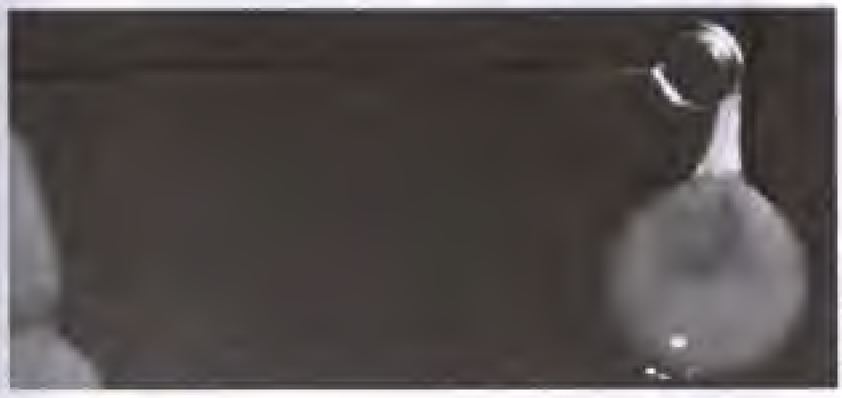
Leuconostoc mesenteroides y algunas otras bacterias forman dextrano de esta forma, y el polímero se acumula alrededor de las células como una cápsula o limo grueso (Figura 17.64). Como la formación de dextrano requiere sacarosa, este polímero no se forma cuando la bacteria se cultiva en un medio con glucosa o fructosa. En la naturaleza, cuando mueren las células que contienen dextrano u otro material capsular, estos materiales vuelven a quedar disponibles para ser atacados por microorganismos fermentadores u otros quimioorganotrofos.

✓ *17.25 Revisión de conceptos*

Los polisacáridos son abundantes en la naturaleza y generalmente se degradan por fosforólisis en monómeros de hexosa o pentosa que se emplean como fuente de energía. El almidón y la celulosa son polisacáridos muy comunes.

✓ ¿Qué es la *fosforólisis*?

✓ ¿Qué disacáridos son frecuentes en la naturaleza?



T. D. Brock

Figura 17.64 Colonia mucosa formada por la bacteria productora de dextrano *Leuconostoc mesenteroides*, creciendo en un medio que contiene sacarosa. Cuando el mismo microorganismo crece en glucosa, las colonias son pequeñas y no mucosas, porque la síntesis de dextrano requiere sacarosa (*véase* Sección 21.3 para más discusión).

17.26 Metabolismo de los ácidos orgánicos

Los microorganismos pueden usar diversos ácidos orgánicos como fuentes de carbono y donadores de electrones. Los ácidos del ciclo del ácido cítrico, como el *citrato*, *malato*, *fumarato* y *succinato* son productos naturales frecuentes formados por las plantas y también productos de las fermentaciones microbianas. Como el ciclo del ácido cítrico tiene importantes funciones *biosintéticas* (*véase* Sección 5.15), así como *energéticas* (*véase* Sección 5.13), el ciclo completo, o su mayor parte, está presente casi universalmente en los microorganismos. Por tanto, no sorprende que muchos microorganismos usen estos ácidos como donadores de electrones y fuentes de carbono. La utilización aeróbica de ácidos de cuatro, cinco y seis carbonos se puede realizar mediante enzimas del ciclo del ácido cítrico, con formación de ATP por fosforilación oxidativa.

Normalmente, en la utilización anaeróbica de ácidos orgánicos hay una conversión a piruvato seguida de formación de acetato vía acetil fosfato, con la consiguiente producción de ATP por forsforilación a nivel de sustrato (Sección 17.19).

Ciclo del glioxilato

El empleo de ácidos con dos o tres carbonos como fuentes de carbono no se puede realizar sólo mediante el ciclo del ácido cítrico. Este ciclo solamente puede continuar funcionando si la molécula aceptora, el ácido de cuatro carbonos *oxalacetato*, se regenera en cada vuelta del ciclo; cualquier pérdida de compuestos carbonados para reacciones biosintéticas impediría completar el ciclo. Cuando se emplea acetato, el oxalacetato necesario para continuar el ciclo se obtiene a través del **ciclo del glioxilato** (Figura 17.65), llamado así porque el glioxilato es un intermediario clave. Este ciclo se compone de la mayor parte de las reacciones del ciclo del ácido cítrico más dos enzimas adicionales: la *isociatrato liasa*, que separa el isocitrato en succinato y glioxilato, y la *malato sintasa*, que convierte el glioxilato y acetil-CoA en malato (*véase* Figura 17.65).

La biosíntesis mediante el ciclo del glioxilato se produce de la siguiente forma. La separación del isocitrato en succinato y glioxilato permite que la molécula de succinato (u otro intermediario derivado del ciclo del ácido cítrico) se pueda utilizar con fines biosintéticos porque el glioxilato se combina con acetil-CoA para formar malato. El malato se puede convertir en oxalacetato para mantener la naturaleza cíclica del ciclo del ácido cítrico a pesar de que se haya extraído de él un intermediario C_4 (succinato). La molécula de succinato se puede usar directamente en la producción de porfirinas, ser oxidada a oxalacetato y servir como esqueleto carbonado para aminoácidos C_4, o convertirse (vía oxalacetato y fosfoenolpiruvato) en glucosa.

Utilización de piruvato y de C_3

Los compuestos con tres carbonos, como el piruvato o compuestos convertibles en piruvato (por ejemplo, lactato o carbohidratos), tampoco se pueden usar como fuente de ener-

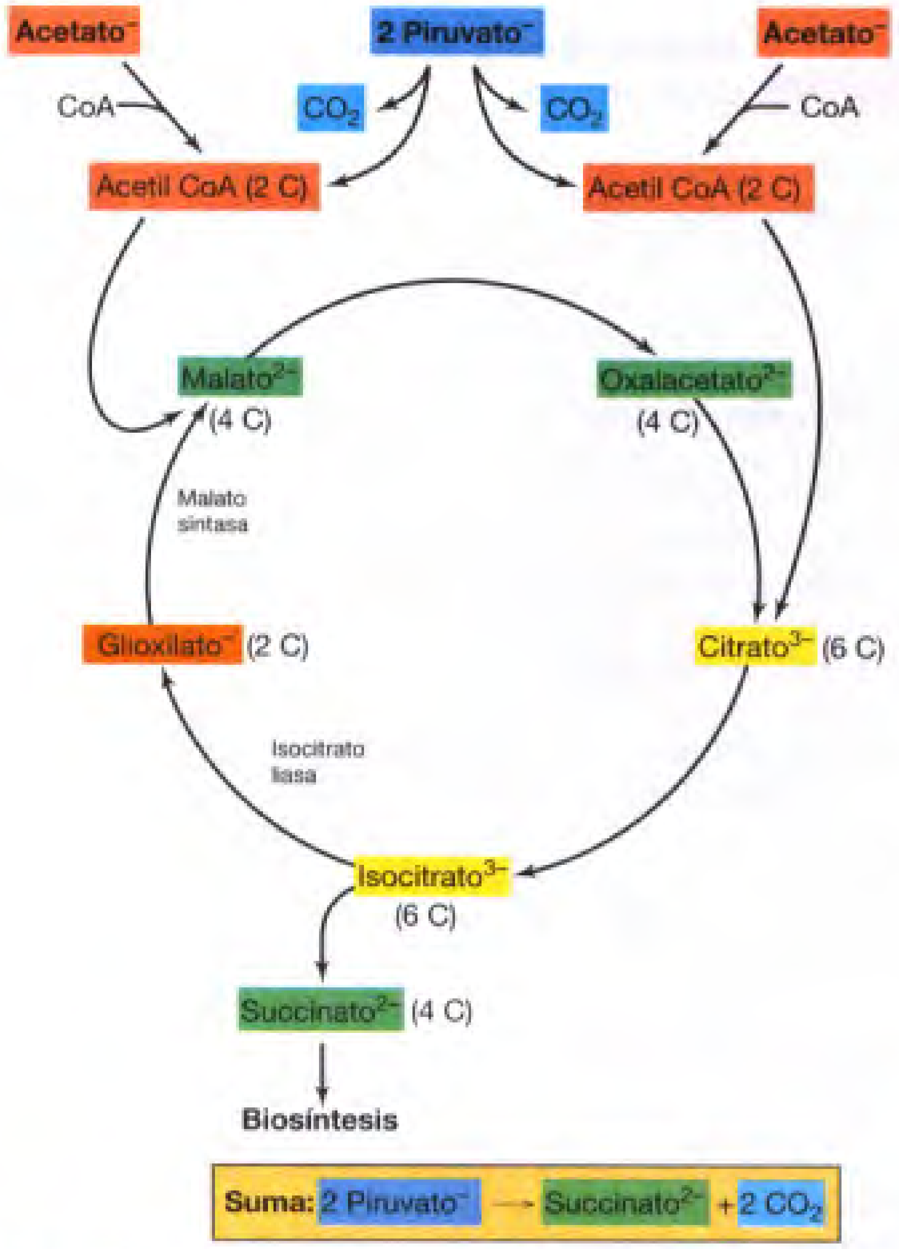

Acetato⁻
2 Piruvato⁻
Acetato⁻
CoA
CO₂
CO₂
CoA
Acetil CoA (2 C)
Acetil CoA (2 C)
Malato²⁻ (4 C)
Oxalacetato²⁻ (4 C)
Malato sintasa
Glioxilato⁻ (2 C)
Citrato³⁻ (6 C)
Isocitrato liasa
Isocitrato³⁻ (6 C)
Succinato²⁻ (4 C)
Biosíntesis
Suma: 2 Piruvato⁻ → Succinato²⁻ + 2 CO₂

Figura 17.65 El ciclo del glioxalato, que conduce a la formación de oxalacetato a partir de acetato. Dos enzimas exclusivas, la *isocitrato liasa* y la *malato sintasa*, operan en la mayoría de las reacciones del ciclo del ácido cítrico. Además de crecer con piruvato, el ciclo del glioxilato también puede darse durante el crecimiento con acetato. Todos los compuestos que contienen idéntico número de carbonos se muestran en el mismo color.

gía a través del ciclo del ácido cítrico solamente. El oxalacetato necesario para mantener funcionando el ciclo, cuando alguno de los intermediarios se utiliza para biosíntesis, se forma a partir de piruvato o fosfoenolpiruvato por la adición de un átomo de carbono procedente del CO_2. En algunos microorganismos esta reacción está catalizada por la enzima *piruvato carboxilasa*:

$$\text{Piruvato} + \text{ATP} + CO_2 \rightarrow \text{oxalacetato} + \text{ADP} + P_i$$

mientras que en otros está catalizada por la *fosfoenolpiruvato carboxilasa*:

$$\text{Fosfoenolpiruvato} + CO_2 \rightarrow \text{oxalacetato} + P_i$$

Estas reacciones reponen el oxalacetato perdido cuando se extraen intermediarios del ácido cítrico para su uso en la biosíntesis, y así el ciclo puede continuar funcionando.

✓ 17.26 Revisión de conceptos

Los ácidos orgánicos se metabolizan frecuentemente mediante el ciclo del ácido cítrico o por el ciclo del glioxilato. La isocitrato liasa y la malato sintasa son las enzimas clave del ciclo del glioxilato.

✓ ¿Por qué es necesario el ciclo del glioxilato para crecer en acetato pero no en succinato?

17.27 Los lípidos como nutrientes microbianos

Los lípidos abundan en la naturaleza. Las membranas citoplasmáticas de todas las células contienen lípidos, y muchos microorganismos, así como organismos superiores, producen materiales lipídicos de reserva. Estas sustancias son todas biodegradables y constituyen excelentes sustratos para el metabolismo microbiano productor de energía.

Hidrólisis de triglicéridos y fosfolípidos

Las grasas o triglicéridos son ésteres de glicerol y ácidos grasos (*véase* Sección 3.4). Los microorganismos utilizan los triglicéridos después de la hidrólisis del enlace éster que llevan a cabo las enzimas extracelulares llamadas **lipasas**

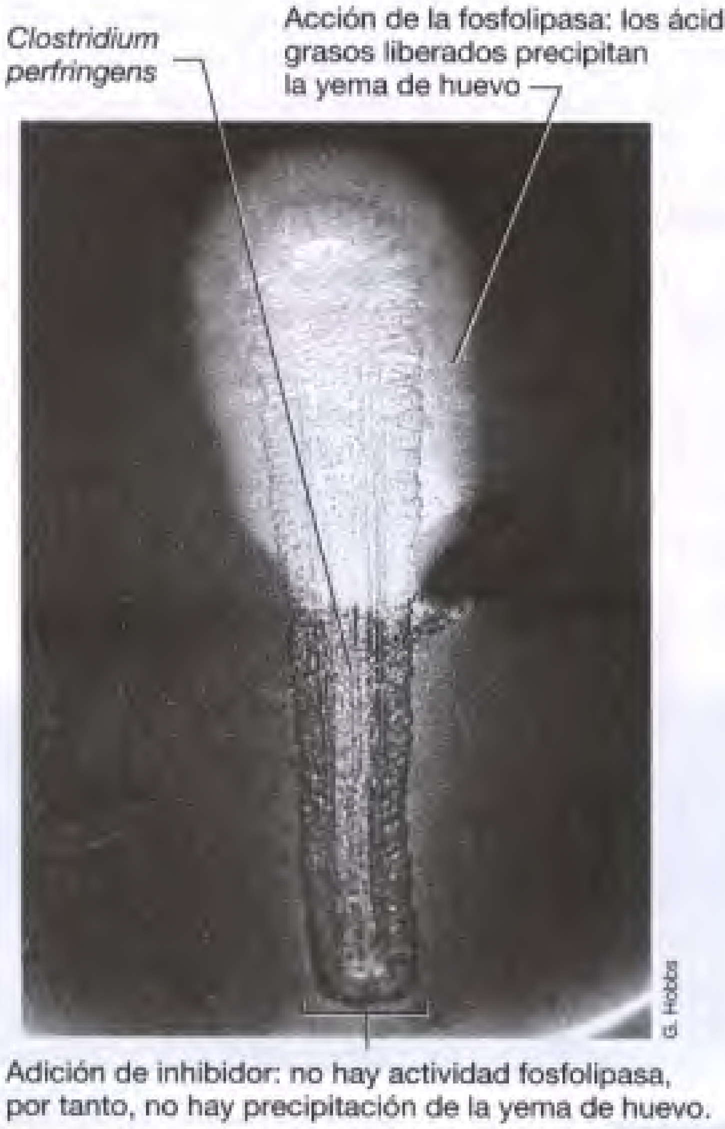

Clostridium perfringens
Acción de la fosfolipasa: los ácidos grasos liberados precipitan la yema de huevo
G. Hobbs
Adición de inhibidor: no hay actividad fosfolipasa, por tanto, no hay precipitación de la yema de huevo.

Figura 17.66 Acción de la fosfolipasa alrededor de una estría de *Clostridium perfringens* creciendo en medio sólido que contiene yema de huevo. En la mitad de la placa, se añadió un inhibidor de la fosfolipasa, que impide que actúe la enzima.

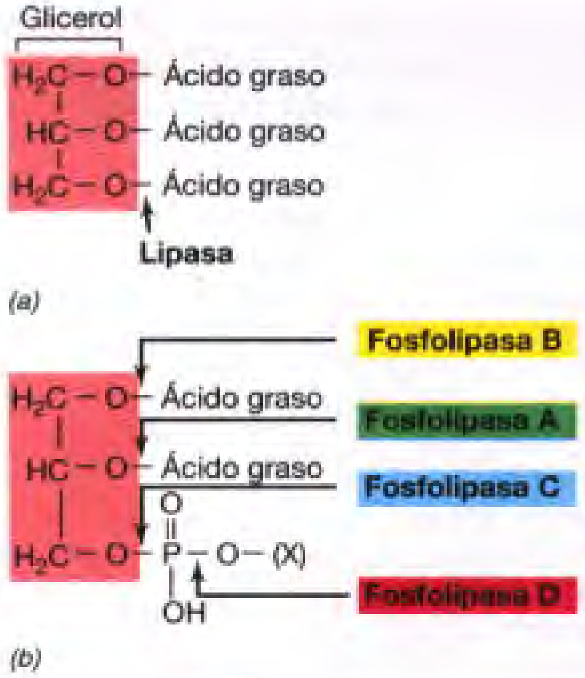

Glicerol
H_2C-O- Ácido graso
$HC-O-$ Ácido graso
H_2C-O- Ácido graso
Lipasa
(a)
Fosfolipasa B
H_2C-O- Ácido graso
Fosfolipasa A
$HC-O-$ Ácido graso
Fosfolipasa C
$H_2C-O-P(=O)(OH)-O-(X)$
Fosfolipasa D
(b)

Figura 17.67 (a) Acción de la lipasa sobre un triglicérido. (b) Acción de la fosfolipasa sobre un fosfolípido. Se indican los lugares de acción de las cuatro fosfolipasas A, B, C y D. X designa un número de moléculas orgánicas pequeñas que se pueden encontrar en esta posición en diferentes fosfolípidos. Compárese este diagrama con la estructura más completa de un fosfolípido de la Figura 3.7.

(Figura 17.66). El resultado final es la formación de glicerol y ácidos grasos libres (Figuras 17.66 y 17.67). Las lipasas no son muy específicas y atacan triglicéridos con ácidos grasos de longitud de cadena variable. Los fosfolípidos se hidrolizan por enzimas específicas llamadas *fosfolipasas*, a las que se asigna una letra según el enlace éster que rompen (Figura 17.67). Las fosfolipasas A y B liberan ácidos grasos y se parecen, por tanto, a las lipasas descritas antes, pero las fosfolipasas C y D rompen enlaces éster del fosfato y, en consecuencia, son un tipo de enzima muy diferente. El resultado de la acción de una lipasa es la liberación de ácidos grasos y glicerol, y todas estas sustancias pueden ser atacadas tanto anaeróbica como aeróbicamente por diferentes microorganismos quimioorganotrofos.

Oxidación de ácidos grasos

Los ácidos grasos se oxidan por un proceso denominado *β-oxidación*, en el que se liberan a la vez dos carbonos del ácido graso (Figura 17.68). En los eucariotas, las enzimas responsables están en las mitocondrias, mientras que en los procariotas son citoplasmáticas. El ácido graso se activa primero con coenzima A; la oxidación es producto de la liberación de *acetil-CoA* y de la formación de un ácido graso más corto en dos carbonos (Figura 17.68). El proceso de β-oxidación se repite y se libera otra molécula de acetil-CoA. Se producen dos reacciones de deshidrogenación independientes. En la primera, se transfieren electrones a flavín-adenina dinucleótido (FAD), mientras que en la segunda, se transfieren a NAD$^+$. La mayor parte de los ácidos grasos tienen un número par de átomos de carbono, y la oxidación completa produce sólo acetil-CoA. El acetil-CoA formado se oxida luego mediante el ciclo del ácido cítrico o se convierte en hexosas y otros constituyentes celulares mediante el ciclo del glioxilato. Los ácidos grasos son buenos donadores de electrones. Por ejemplo, la oxidación anaeróbica del ácido palmítico, ácido graso de 16 carbonos, origina una síntesis neta de 129 moléculas de ATP. Este ATP es producido por la fosforilación debida al transporte de electrones generados durante la formación de acetil-CoA por β-oxidaciones, y por la oxidación de las unidades de acetil-CoA por el ciclo del ácido cítrico (*véase* Sección 5.13).

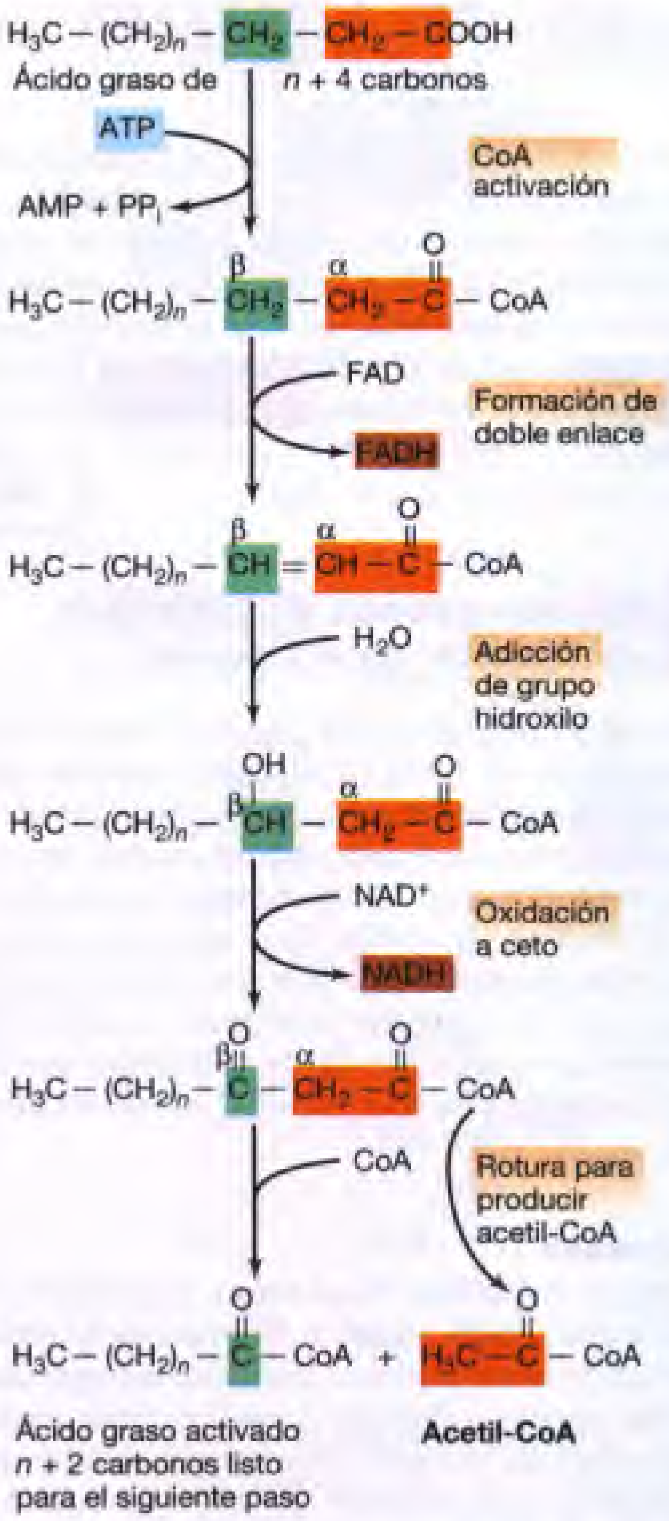

$H_3C-(CH_2)_n-CH_2-CH_2-COOH$
Ácido graso de
n + 4 carbonos
ATP
AMP + PP$_i$
CoA activación
β
α
$H_3C-(CH_2)_n-CH_2-CH_2-C(=O)-CoA$
FAD
FADH
Formación de doble enlace
$H_3C-(CH_2)_n-CH=CH-C(=O)-CoA$
H_2O
Adicción de grupo hidroxilo
$H_3C-(CH_2)_n-CH(OH)-CH_2-C(=O)-CoA$
NAD$^+$
NADH
Oxidación a ceto
$H_3C-(CH_2)_n-C(=O)-CH_2-C(=O)-CoA$
CoA
Rotura para producir acetil-CoA
$H_3C-(CH_2)_n-C(=O)-CoA$ + $H_3C-C(=O)-CoA$
Ácido graso activado
n + 2 carbonos listo
para el siguiente paso
Acetil-CoA

Figura 17.68 Mecanismo de β-oxidación de un ácido graso, que origina la formación sucesiva de fragmentos bicarbonados de acetil-CoA.

✓ 17.27 Revisión de conceptos

Los triglicéridos y fosfolípidos se metabolizan por hidrólisis debida a lipasas o fosfolipasas. Los ácidos grasos libres se oxidan por β-oxidación a unidades de acetil-CoA, que luego se oxidan a CO_2 por el ciclo del ácido cítrico.

- ✓ ¿Qué funciones tienen las fosfolipasas?
- ✓ ¿Qué significa el término *β-oxidación*?

V FIJACIÓN DEL NITRÓGENO

La utilización del nitrógeno gaseoso (N_2) como fuente de nitrógeno celular se denomina *fijación del nitrógeno*. La capacidad de un organismo de fijar N_2 lo libera de su dependencia de formas fijadas de nitrógeno. Como en los ecosistemas microbianos hay una elevada demanda por estas últimas, la capacidad de fijar N_2 dota de una ventaja ecológica significativa a las células que pueden llevar a cabo el proceso.

TABLA 17.10 Algunos organismos fijadores de nitrógeno

Aerobios de vida libre		
Quimioorganismos	**Fototrofos**	**Quimiolitotrofos**
Dominio *Bacteria*: *Azotobacter* spp. *Azomonas* *Klebsiella*[a] *Beijerinckia* *Bacillus polymyxa* *Mycobacterium flavum* *Azospirillum lipoferum* *Citrobacter freundii* *Acetobacter diazotrophicus* *Methylomonas* *Methylococcus*	Cianobacterias (la mayoría, pero no todas)	*Alcaligenes* *Thiobacillus* (algunas especies) *Streptomyces thermoautotrophicus*
Anaerobios de vida libre		
Quimioorganismos	**Fototrofos**	**Quimiolitotrofos**
Dominio *Bacteria*: *Clostridium* spp. *Desulfovibrio* *Desulfotomaculum*	Dominio *Bacteria*: *Chromatium* *Thiocapsa* *Chlorobium* *Rhodospirillum* *Rhodopseudomonas* *Rhodomicrobium* *Rhodopila* *Rhodobacter* *Heliobacterium* *Heliobacillus* *Heliophilum*	Dominio *Archaea*: *Methanosarcina* *Methanococcus* *Methanobacterium* *Methanospirillum* *Methanolobus*
Simbióticos		
Plantas leguminosas	**Plantas no leguminosas**	
Soja, guisante, trébol, etc., en asociación con una bacteria de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* o *Azorhizobium*	*Alnus*, *Myrica*, *Ceanothus*, *Comptonia* y *Casuarina*; en asociación con actinomicetos del género *Frankia*	

[a] La fijación de N_2 tiene lugar sólo en condiciones anóxicas.

17.28 La nitrogenasa y el proceso de fijación de nitrógeno

La fijación de nitrógeno es un proceso exclusivo de algunos procariotas. La Tabla 17.10 ofrece una lista abreviada de organismos fijadores de nitrógeno; puede apreciarse que una gran variedad de procariotas, anaerobios y aerobios, fijan nitrógeno. Además, hay algunas bacterias llamadas *simbióticas*, que sólo fijan nitrógeno en asociación con ciertas plantas. Hasta ahora no se conoce ningún organismo eucariota que fije nitrógeno. La fijación simbiótica de nitrógeno, proceso de enorme importancia en la agricultura (por ejemplo, soja y alfalfa), se tratará en la Sección 19.22.

La nitrogenasa

En el proceso de fijación, el N_2 se *reduce* a amoníaco, que es convertido a una forma orgánica. El proceso de reducción está catalizado por el complejo enzimático **nitrogenasa**, que consta de dos proteínas distintas llamadas *dinitrogenasa* y *dinitrogenasa reductasa*. Ambos componentes contienen hierro y la dinitrogenasa contiene además molibdeno. En la dinitrogenasa, el hierro y el molibdeno forman parte de un cofactor conocido como *FeMo-co* (Figura 17.69), que es el centro donde se produce la reducción real del N_2. La composición del FeMo-co es $MoFe_7S_8$ homocitrato (Figura 17.69), y se presentan dos copias de FeMo-co ~~por~~ molécula de nitrogenasa.

Debido a la estabilidad del triple enlace $N \equiv N$ (que tiene una energía de disociación de 940 kJ, comparada con los 493 kJ del doble enlace del O_2), el N_2 es muy inerte y su activación es un proceso que requiere mucha energía. Se deben transferir seis electrones para reducir el N_2 a $2\ NH_3$ a través de una serie de pasos intermedios. Se cree que los tres pasos sucesivos de reducción se producen directamente en la nitrogenasa, sin acumulación de intermediarios libres (Figura 17.70). La fijación de nitrógeno en la naturaleza es muy reductora y el oxígeno inhibe el proceso porque la dinitrogenasa reductasa es inactivada rápida e irreversiblemente por el O_2 (incluso cuando se aísla de fijadores de nitrógeno *aeróbicos*). En las bacterias fijadoras de N_2 aeróbicas, la fijación de N_2 se realiza en presencia de O_2 en células enteras pero no en preparaciones purificadas de la enzima. En estos organismos, la nitrogenasa se protege de la inactivación por el O_2, bien sea eliminando rápidamente el O_2 por respiración, bien produciendo capas mucosas que retardan el O_2, o bien mediante la compartimentación de la nitrogenasa en un tipo especial de célula (el heterocisto) (*véase* Sección 12.26). Además, aunque la fijación de N_2 no tiene lugar en extractos celulares óxicos, en fijadores aerobios de nitrógeno como *Azotobacter* la nitrogenasa se protege de la inactivación por el oxígeno mediante formación de complejos con una proteína específica. Este proceso se conoce como *protección conformacional*.

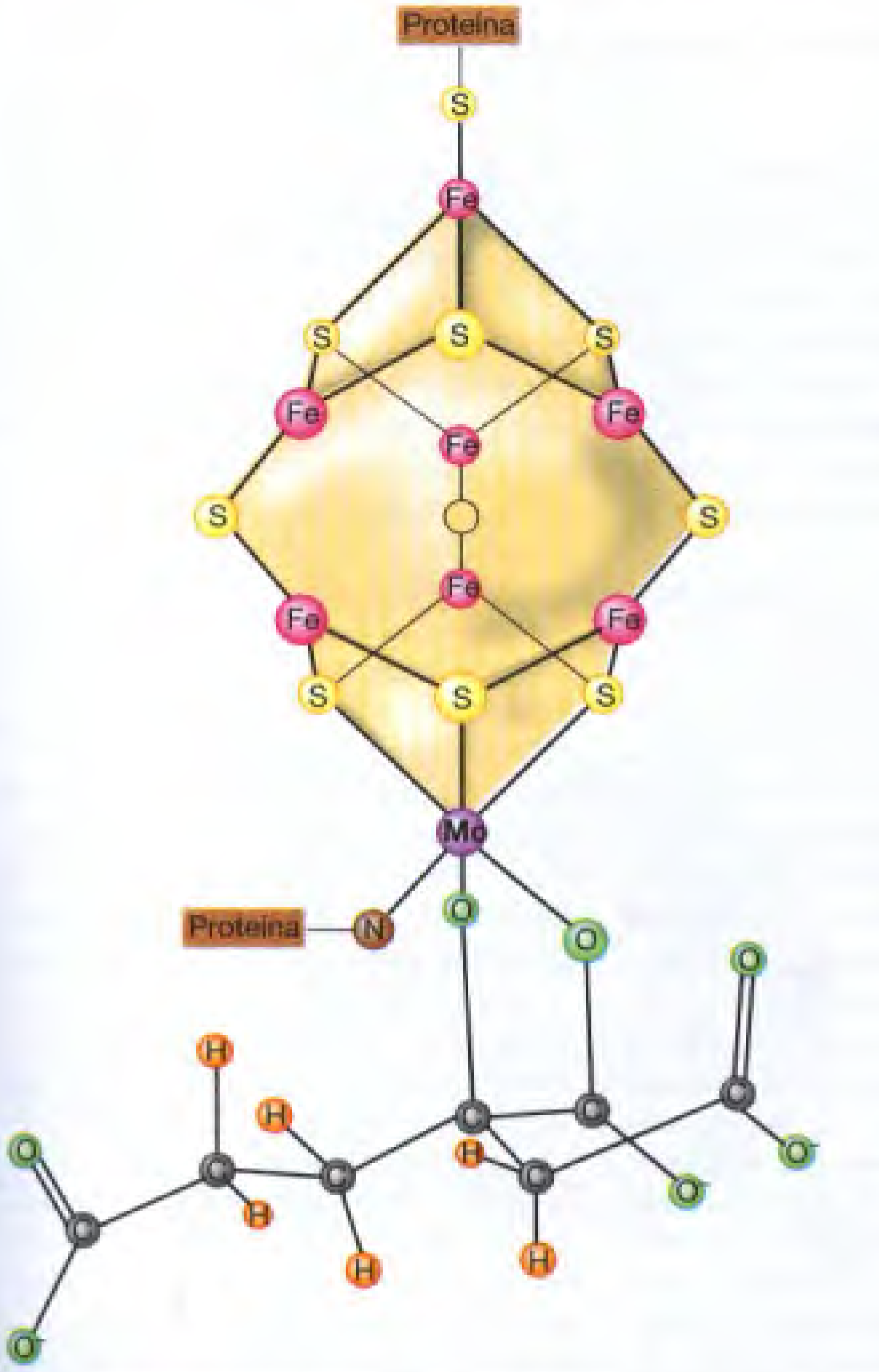

Proteína
S
Fe
S
S
S
Fe
Fe
Fe
S
S
Fe
Fe
Fe
S
S
S
Mo
Proteína
N
O
O
O
O
O
O
O
H
H
H
H
H
H

Figura 17.69 Estructura de FeMo-co, el cofactor con hierro y molibdeno de la nitrogenasa. El cubo Fe_7S_8 se une al molibdeno, y esta estructura se une a los átomos de oxígeno del homocitrato (todos los átomos de oxígeno se muestran en verde) y a los átomos de N y S de la dinitrogenasa. Por cada molécula de nitrogenasa hay dos moléculas de FeMo-co.

Nitrogenasas alternativas

Algunas bacterias fijadoras de nitrógeno sintetizan nitrogenasas sin molibdeno en ciertas condiciones de crecimiento; son las denominadas *nitrogenasas alternativas*, que carecen de molibdeno y en su lugar contienen vanadio (y hierro) o solamente hierro. Las nitrogenasas alternativas también presentan cofactores similares a FeMo-co: son el FeVa-co en la nitrogenasa con vanadio y una agrupación de sulfuro de hierro parecida a FeMo-co y FeVa-co, pero sin molibdeno ni vanadio en la nitrogenasa con hierro. Las nitrogenas alternativas no se sintetizan cuando hay suficiente molibdeno, ya que, por lo general, la nitrogenasa con molibdeno es la principal nitrogenasa de la célula. Las nitrogenasas alternativas se supone que sirven como mecanismo de apoyo para asegurar que se produce fijación de N_2 cuando hay limitación de molibdeno en el hábitat (*véase* Sección 12.9). Se ha descubierto una nitrogenasa con molibdeno funcional y estructuralmente novedosa en el estreptomiceto termófilo *Streptomyces thermoautotrophicus*. En el cuadro de texto «El poder de la diversidad metabólica: una nueva nitrogenasa» se comparan sus propiedades con las de las nitrogenasas con molibdeno clásicas.

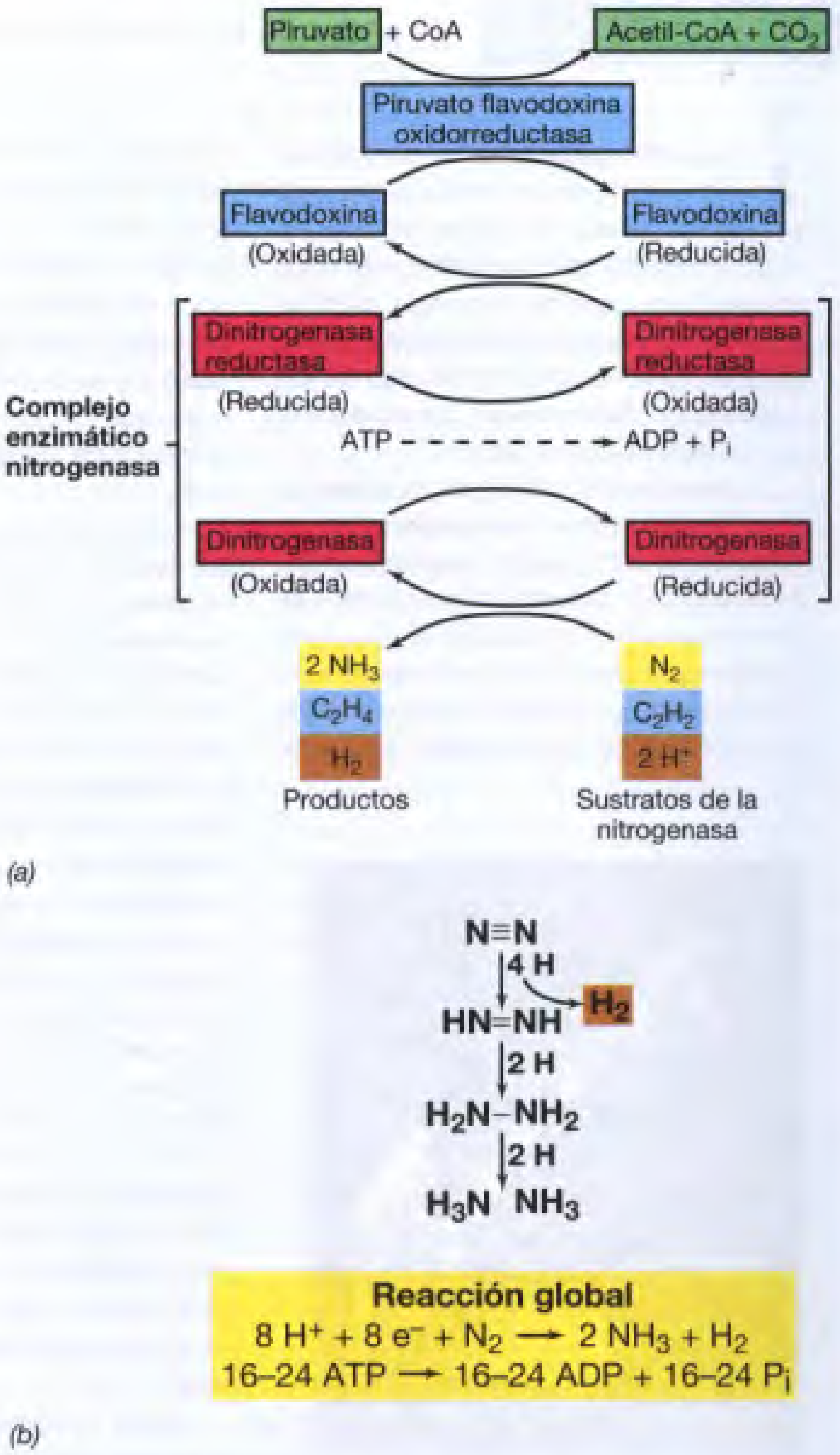

Piruvato + CoA
Acetil-CoA + CO_2
Piruvato flavodoxina oxidorreductasa
Flavodoxina (Oxidada)
Flavodoxina (Reducida)
Complejo enzimático nitrogenasa
Dinitrogenasa reductasa (Reducida)
Dinitrogenasa reductasa (Oxidada)
ATP → ADP + P_i
Dinitrogenasa (Oxidada)
Dinitrogenasa (Reducida)
2 NH_3
C_2H_4
H_2
Productos
N_2
C_2H_2
2 H^+
Sustratos de la nitrogenasa
(a)
N≡N
4 H
H_2
HN=NH
2 H
H_2N-NH_2
2 H
H_3N NH_3
Reacción global
$8 H^+ + 8 e^- + N_2 \longrightarrow 2 NH_3 + H_2$
16–24 ATP → 16–24 ADP + 16–24 P_i
(b)

Figura 17.70 Función de la nitrogenasa. (a) Pasos de la fijación de N_2 empezando por el piruvato. Los electrones son aportados desde la dinitrogenasa reductasa a la dinitrogenasa, de uno en uno, y cada electrón se asocia con la hidrólisis de 2-3 ATPs. (b) Pasos hipotéticos en la reducción de N_2 mostrando el paso de liberación de H_2 y un resumen de la actividad nitrogenasa.

Flujo de electrones en la fijación de nitrógeno

La secuencia de transferencia de electrones en la nitrogenasa es la siguiente: donador de electrones → reductasa de la dinitrogenasa → dinitrogenasa → N_2 (Figura 17.70). Los electrones para la reducción del nitrógeno se transfieren a

Atención a ... El poder de la diversidad metabólica: una nueva nitrogenasa

Las dinitrogenasas se han caracterizado a partir de una amplia variedad de procariotas, donde se incluyen algunas *Archaea*, todos los cuales muestran una significativa homología de secuencia, tanto al nivel de gen como al de polipéptido: todos ellos, es decir, hasta la nitrogenasa del estreptomiceto *Streptomyces thermoautotrophicus*, están caracterizados[1].

S. thermoautotrophicus es un procariota termófilo filamentoso Gram positivo (temperatura óptima 65°C) que se encuentra de manera natural en el compostaje caliente y en pilas de carbón en combustión (Figura 1). El organismo es una bacteria quimiolitotrofa del H_2 aeróbica, que también utiliza monóxido de carbono (CO) como donador de electrones. Aunque *S. thermoautotrophicus* era conocido como fijador de nitrógeno, algunas propiedades poco comunes de su sistema de fijación (como el hecho de que el amoníaco no reprima la síntesis de la nitrogenasa y que la enzima no reduzca acetileno) indujo a examinar más detalladamente su nitrogenasa. Lo que se descubrió representa un paradigma totalmente nuevo en la fijación de N_2.

Ortwin Meyer

Figura 1 Dos pilas de carbón en combustión en un bosque bávaro (Alemania), con la bacteria fijadora de N_2 *Streptomyces thermoautotrophicus*. El investigador está midiendo la temperatura en varios puntos de las pilas. Éstas emiten gases de CO_2, CO, CH_4 y C_2H_2, y la temperatura varía con la profundidad. Desde la superficie hasta unos 15 cm hacia el interior es de menos de 100°C, pero, al profundizar en las pilas, la temperatura puede superar los 300°C. *S. thermoautotrophicus* está activo hasta aproximadamente 75°C, y oxida CO tanto durante su metabolismo energético como durante la fijación de N_2 (*véase* Figura 2).

La nitrogenasa de *S. thermoautotrophicus* contiene Mo, pero, a diferencia de la nitrogenasa Mo clásica, es completamente *insensible* a O_2. El componente dinitrogenasa de la nitrogenasa de *S. thermoautotrophicus*, denominado *Str1*, contiene tres polipéptidos diferentes que muestran algunas semejanzas estructurales con los polipéptidos dinitrogenasa de otros fijadores de nitrógeno; pero el componente dinitrogenasa reductasa, conocido como *Str2*, no muestra ningún parecido con otras dinitrogenasa reductasas. Sin embargo, Str2 muestra una semejanza de secuencia *muy elevada* con las superóxido dismutasas, que contienen manganeso. De hecho, ¡Str2 *es* una superóxido dismutasa! Recuérdese del Capítulo 6 (*véase* Sección 6.13) que la función de la superóxido dismutasa en la célula es consumir superóxido (O_2^-), formando O_2 en el proceso, e impidiendo así el daño oxidativo a los componentes celulares. Pero, ¿qué tiene que ver el superóxido con la fijación de nitrógeno?

Se ha demostrado que Str2 suministra electrones a Str1. La fuente de estos electrones es O_2^-, que se forma a partir de la reducción de O_2 por una CO deshidrogenasa (Figura 2). Es decir, de manera análoga a la secuencia piruvato → flavodoxina → dinitrogenasa reductasa → dinitrogenasa en la fijación clásica de nitrógeno (*véase* Figura 17.70), en *S. thermoautotrophicus* la secuencia es CO → O_2^- → Str2 → Str1. Y, sorprendentemente, el oxígeno, en vez de *inhibir* la nitrogenasa (como sucede con todas las nitrogenasas que se han examinado), en *S. thermoautotrophicus* ¡es *necesario* en el mecanismo de reacción de la enzima!

Claramente, la nitrogenasa de *S. thermoautotrophicus* es un sistema fijador de nitrógeno único, tanto estructural como funcionalmente. Por ahora, se desconoce si este sistema está muy extendido y si su verdadera función en la célula es la fijación de N_2. Sin embargo, el sistema de la nitrogenasa de *S. thermoautotrophicus* es un buen ejemplo de la importancia de conocer bien la diversidad metabólica en procariotas: incluso en sistemas bien estudiados en los que prevalece la regularidad, puede haber ocasionalmente grandes sorpresas y conceptos totalmente nuevos. El caso de *S. thermoautotrophicus* ha renovado también la esperanza de obtener por ingeniería genética un sistema nitrogenasa aplicable a la producción agrícola, por ejemplo, del maíz. El hecho de que esta nitrogenasa no sea lábil al oxígeno y que su requerimiento energético sea mucho menor que el de las nitrogenasas clásicas (según mediciones llevadas a cabo, el sistema de *S. thermoautotrophicus* emplea sólo un 25-50% del ATP que las nitrogeneasas Mo clásicas), podría llegar a convertir en realidad el sueño de disponer algún día de cosechas fijadoras de nitrógeno. ■

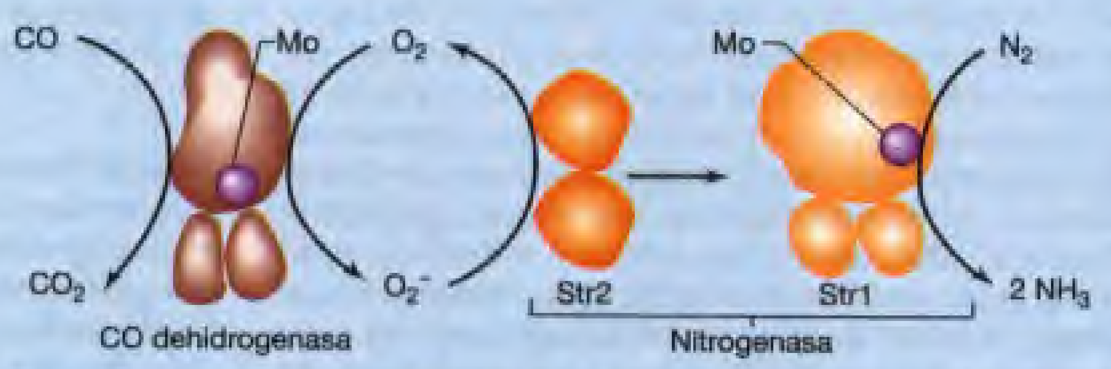


Figura 2 Reacción de la fijación de nitrógeno en *S. thermoautotrophicus*. Aunque son proteínas bastante diferentes de la dinitrogenasa reductasa y la dinitrogenasa, Str2 y Str1 tienen, respectivamente, funciones equivalentes a estas dos proteínas.

---

[1] Ribbe, M., D. Gadkari, y O. Meyer, 1997. *J. Biol. Chem.* 272: 26627-26633.

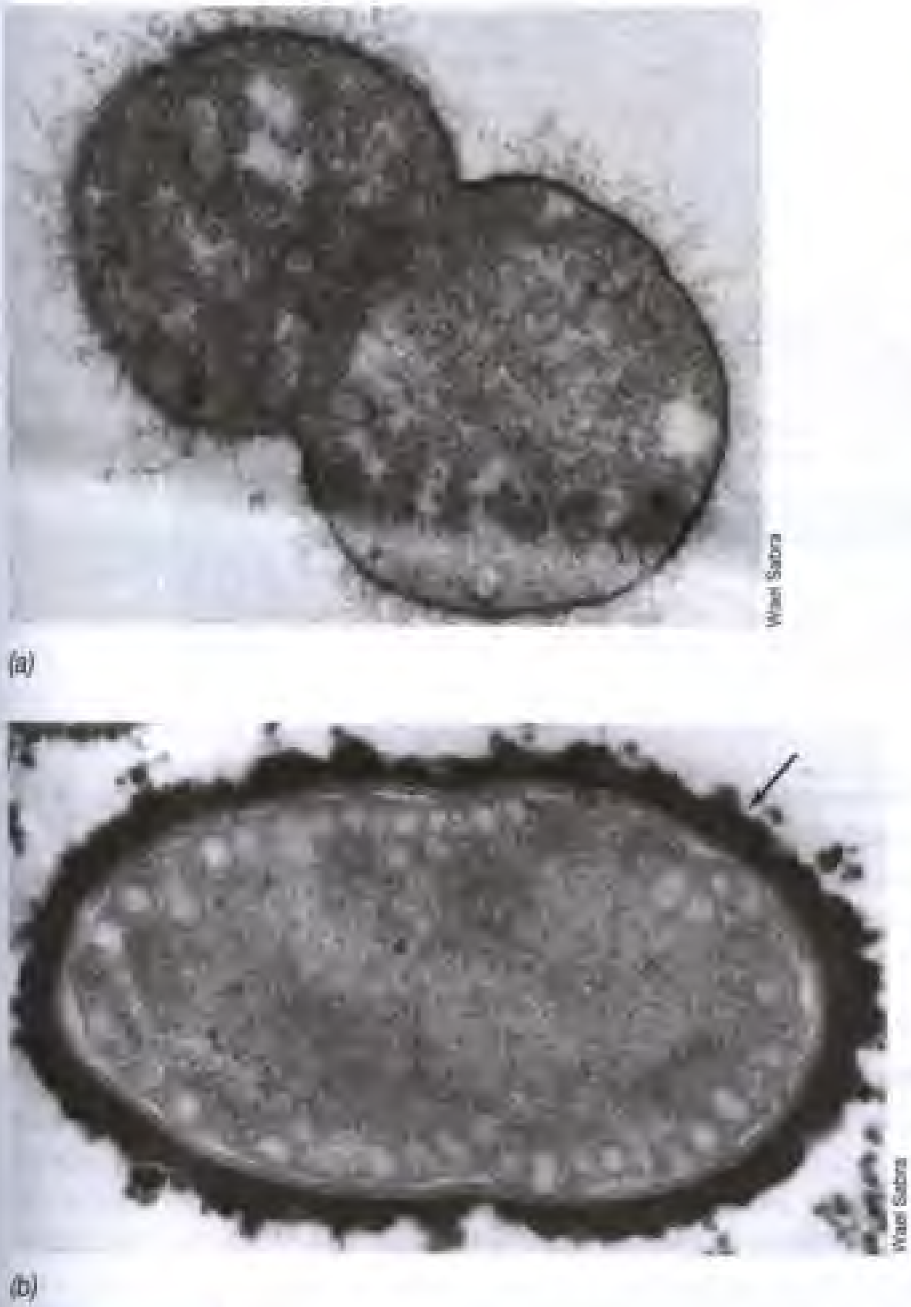


Figura 17.71 Inducción de capas mucosas por el O_2 en células del fijador de nitrógeno *Azotobacter vinelandii*. (a) Micrografía electrónica de transmisión de células cultivadas en condiciones microóxicas de 2,5% O_2; se observa poca mucosidad. (b) Células cultivadas en aire (21% O_2). Obsérvese la extensa capa de mucosidad teñida de oscuro (flecha). La mucosidad retrasa la difusión del O_2 hacia el interior de la célula, impidiendo así la inactivación de la nitrogenasa por el oxigeno.

la nitrogenasa reductasa desde la ferredoxina ~~o la~~ flavodoxina, proteínas de bajo potencial que contienen hierro y azufre. En *Clostridium pasteurianum* el donador de electrones es la ferredoxina, que se reduce por rotura fosforoclástica del piruvato a acetil-CoA + CO_2. Además de ferredoxina reducida, para la fijación de N_2 se necesita ATP. En cada ciclo de transferencia de electrones, la dinitrogenasa reductasa es reducida por ferredoxina/flavodoxina y se une a dos moléculas de ATP. El enlace de ATP altera la conformación de la reductasa dinitrogenasa y disminuye su potencial reductor permitiendo la interacción con la dinitrogenasa. En la transferencia de electrones a la dinitrogenasa, el ATP es hidrolizado y la dinitrogenasa reductasa se disocia de la dinitrogenasa y empieza otro ciclo de reducción y de enlace con ATP (Figura 17.70). Cuando se ha reducido adecuadamente, la dinitrogenasa reduce a continuación el N_2 a NH_3 y la reducción efectiva ocurre en el centro FeMo-co. Aunque sólo se necesitan *seis* electrones para reducir N_2 a 2 NH_3, en el proceso se consumen *ocho* electrones, *dos* de los cuales se pierden como hidrógeno (H_2), por cada mol de N_2 reducido (Figura 17.70). Se desconoce la razón de este aparente exceso, pero los resultados experimentales indican que la producción de H_2 es una parte esencial del mecanismo de reacción de la nitrogenasa.

Ensayos con la nitrogenasa: reducción de acetileno

La nitrogenasa no es totalmente específica de N_2 ya que también reduce cianuro (CN^-), acetileno ($HC \equiv CH$) y otros compuestos de triple enlace (para una excepción *véase* el cuadro de texto). La reducción de acetileno por la nitrogenasa es un proceso de sólo dos electrones y produce *etileno* ($H_2C{=}CH_2$). La reducción de acetileno no tiene probablemente ninguna utilidad para la célula, pero ofrece al experimentador una forma rápida y sencilla de medir la actividad de los sistemas fijadores de nitrógeno, ya que es muy fácil medir la reducción de acetileno a etileno por cromatografía de gases (Figura 17.72). Esta técnica se emplea ahora mucho para detectar la fijación de nitrógeno en sistemas que no se conocen. Anteriormente, no resultaba fácil demostrar que un organismo fijaba N_2; de hecho, en este sentido se ha comprobado que se habían cometido errores en muchos microorganismos. El crecimiento de un organismo en un medio al que no se han añadido compuestos nitrogenados no significa que el organismo fije el nitrógeno del aire. A menudo, los medios de cultivo se contaminan con compuestos traza de nitrógeno fijado, que llegan a través del aire ya sea en forma gaseosa o como partículas de polvo.

La prueba definitiva de la fijación de N_2 se obtiene con un isótopo de nitrógeno, ^{15}N, como trazador. (^{15}N no es un isótopo radiactivo, sino un isótopo estable. Se detecta por espectrometría de masa.) La fase gaseosa de un cultivo se enriquece con ^{15}N y, tras la incubación, las células y el medio son digeridos, el amoníaco producido es destilado y se comprueba el contenido en ^{15}N. Una producción significativa de NH_3 marcado con ^{15}N es prueba de la presencia de fijación de nitrógeno. Sin embargo, el método de reducción de acetileno es un modo más rápido y sensible, aunque indirecto, para medir la fijación de nitrógeno. La muestra, que puede ser de suelo, de agua, un cultivo o un extracto celular, se incuba con acetileno y la mezcla reactiva de la fase gaseosa se analiza después por cromatografía de gases para detectar la producción de etileno (Figura 17.72). Este método es mucho más sencillo y rápido que los otros y de fácil adaptación al trabajo de campo para estudiar directamente bacterias fijadoras de nitrógeno en su hábitat.

17.29 Genética y regulación de la fijación de N_2

El proceso de fijación de N_2 tiene una elevada demanda energética, motivo por el cual el control de la síntesis y actividad de la nitrogenasa es también muy alta. Esta actividad reguladora, así como las enzimas que intervienen en la propia fijación de N_2 (Figura 17.70) precisa de muchos genes, y son los que tratamos a continuación.

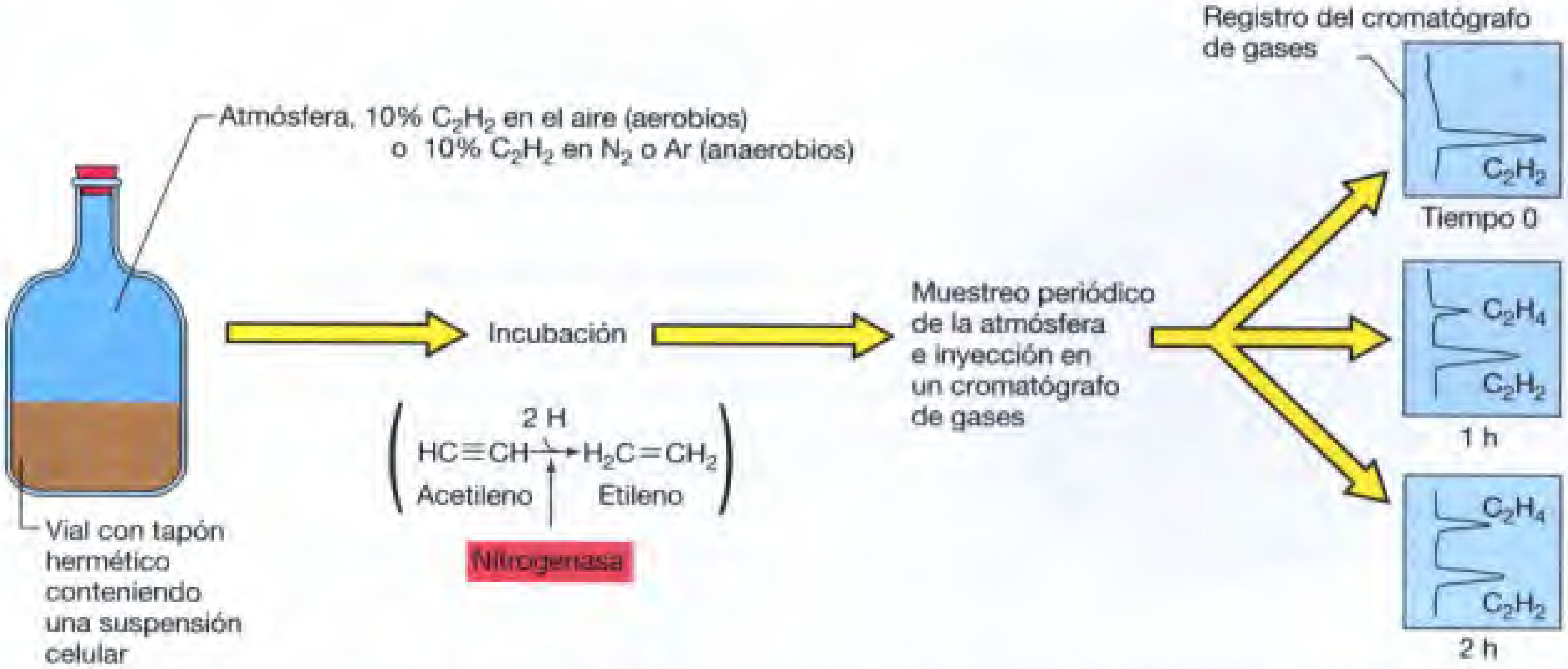

Atmósfera, 10% C_2H_2 en el aire (aerobios)
o 10% C_2H_2 en N_2 o Ar (anaerobios)
Vial con tapón hermético conteniendo una suspensión celular
Incubación
2 H
$HC{\equiv}CH \rightarrow H_2C{=}CH_2$
Acetileno
Etileno
Nitrogenasa
Muestreo periódico de la atmósfera e inyección en un cromatógrafo de gases
Registro del cromatógrafo de gases
C_2H_2
Tiempo 0
C_2H_4
C_2H_2
1 h
C_2H_4
C_2H_2
2 h

Figura 17.72 Ensayo de la reducción de acetileno para determinar la actividad nitrogenasa. Cuando comienza el experimento (tiempo 0), los resultados no muestran C_2H_4, pero, a medida que pasa el tiempo, la producción de C_2H_4 aumenta. Obsérvese que cuando se produce C_2H_4, se consume C_2H_2. Si el vial contuviera un extracto enzimático, las condiciones deberían ser anóxicas, aunque la nitrogenasa procediera de una bacteria aeróbica.

Genética de la fijación de nitrógeno

En *Klebsiella pneumoniae*, que es un fijador de N_2 muy estudiado, los genes de la dinitrogenasa y de la dinitrogenasa reductasa son parte de un regulón (un gran sistema de operones) complejo denominado *regulón nif* (Figura 17.73). En *K. pneumoniae*, el regulón *nif* ocupa 24 kb de DNA y contiene 20 genes dispuestos en varias unidades transcripcionales (Figura 17.73). En el regulón *nif* están presentes, además de los genes estructurales de la nitrogenasa, los genes para FeMo-co, los que controlan las proteínas del transporte de electrones y varios genes reguladores. La dinitrogenasa es una proteína compleja formada por dos subunidades, la α (producto del gen *nifD*) y la β (producto del gen *nifK*), cada una de las cuales está presente en dos copias. La dinitrogenasa reductasa es una proteína dimérica que consta de dos subunidades idénticas, producto del gen *nifH*. FeMo-co se sintetiza con la participación de varios genes, incluyendo *nifN, V, Z, W, E* y *B*, así como *Q*, que controla un producto responsable del procesamiento del molibdeno. El gen *nifA* codifica un regulador positivo que sirve para activar la transcripción de otros genes *nif*.

La nitrogenasa es una proteína altamente conservada y los genes *nifHDK* del nitrógeno se han usado como sondas moleculares para cribar DNA de varios procariotas con objeto de detectar la presencia de genes homólogos. En todos los fijadores de nitrógeno examinados (excepto en un caso tan peculiar como el de *Streptomyces thermoautotrophicus*, *véase* el cuadro de texto), genes similares a *nifHDK* están presentes, lo que sugiere que los requerimientos genéticos para la nitrogenasa son bastante específicos. Otras nitrogenasas alternativas están codificadas por sus propios genes, *vnfHDK* en el sistema vanadio, y *anfHDK* en el sistema de sólo hierro. Ambas muestran una significativa homología en sus secuencias con *nifHDK*.

Regulación de la fijación de nitrógeno

La nitrogenasa está sometida a controles regulatorios muy estrictos. La fijación de nitrógeno se bloquea por O_2 y por nitrógeno fijado, incluyendo NH_3, NO_3^- y algunos aminoácidos (*véase* cuadro). La mayor parte de esta regulación es a nivel transcripcional. Las distintas unidades transcripcionales del regulón *nif* se muestran en la Figura 17.72. Mientras que la transcripción de los genes estructurales *nif* es *activada* por la proteína NifA (regulación positiva), NifL es un regulador *negativo* de la expresión del gen *nif* y contiene una molécula de FAD (hay que recordar que FAD es una coenzima redox para flavoproteínas, *véase* Sección 5.11) que es crítica para la percepción de O_2 por la proteína. En presencia de O_2 en cantidad suficiente, la función de NifL es interrumpir la transcripción de genes *nif*, a fin de evitar la síntesis de la nitrogenasa sensible al oxígeno. El amoníaco reprime la fijación de N_2 mediante una segunda proteína, la llamada NtrC, cuya actividad está regulada por el estado de nitrógeno de la célula. Cuando hay limitación de amoniaco, NtrC activa y promueve la transcripción de *nifA*, lo cual da lugar a la producción de NifA, la proteína activadora de la fijación de nitrógeno, y se inicia la transcripción de *nif*.

El amoníaco producido por la nitrogenasa no reprime la síntesis de la enzima porque, tan pronto como se forma, se incorpora a forma orgánica y se usa en la biosíntesis. Pero cuando hay exceso de amoníaco (cuando hay niveles altos en el medio), la síntesis de nitrogenasa se reprime rápidamente. De esta forma, se evita malgastar ATP en la elaboración de un producto que ya está presente en gran cantidad. En algunas bacterias fijadoras de nitrógeno, la *actividad* de la nitrogenasa también está regulada por amoníaco, un fenómeno llamado efecto «interruptor» del amoníaco. En este caso, el exceso de amoníaco da lugar a una modifica-

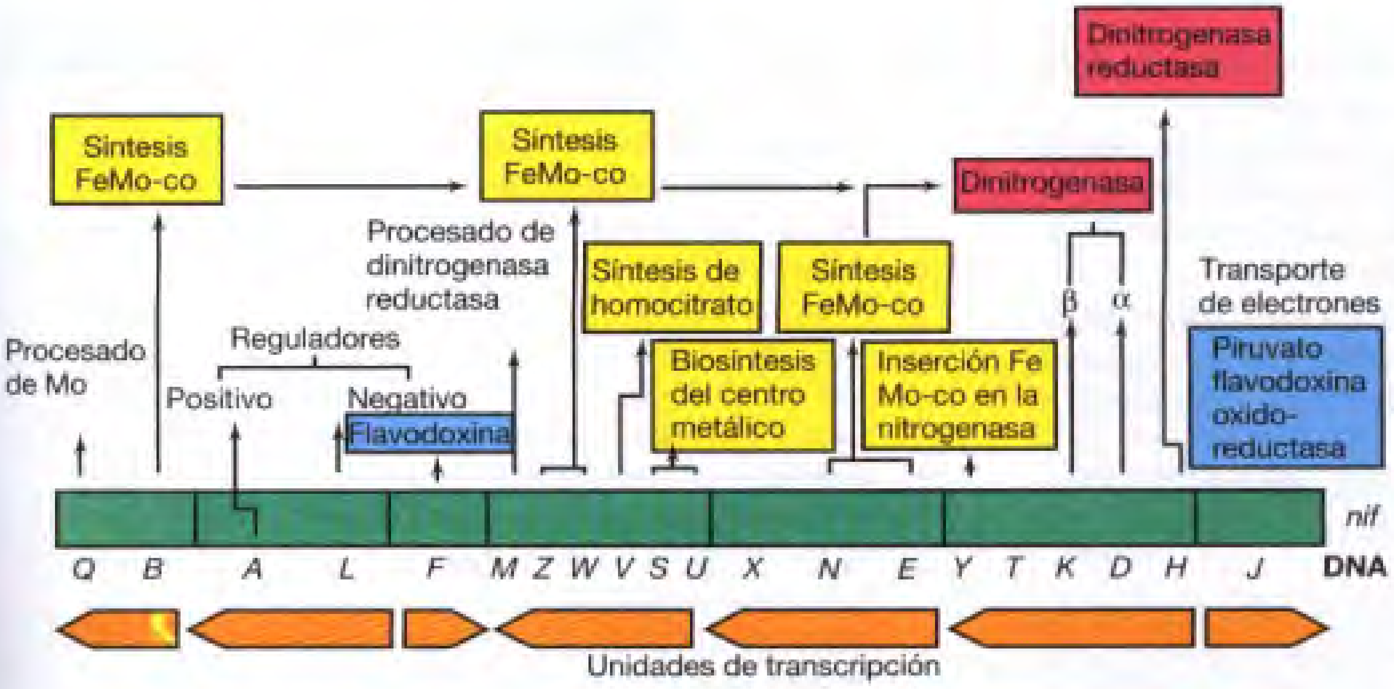

Dinitrogenasa reductasa
Síntesis FeMo-co
Síntesis FeMo-co
Dinitrogenasa
Procesado de dinitrogenasa reductasa
Síntesis de homocitrato
Síntesis FeMo-co
β
α
Transporte de electrones
Procesado de Mo
Reguladores
Positivo
Negativo
Flavodoxina
Biosíntesis del centro metálico
Inserción Fe Mo-co en la nitrogenasa
Piruvato flavodoxina oxido-reductasa
nif
Q B A L F M Z W V S U X N E Y T K D H J
DNA
Unidades de transcripción

Figura 17.73 El regulón *nif* de *Klebsiella pneumoniae*, el organismo fijador de nitrógeno mejor conocido. La función de algunos de estos genes es desconocida. Los tránscritos (unidades de transcripción) de mRNA se muestran bajo los genes; las flechas indican la dirección de la transcripción. Las proteínas implicadas en la síntesis de FeMo-co están coloreadas de amarillo. Los demás colores corresponden a los de la Figura 17.70. Aunque capaz de crecer aeróbicamente con amoníaco como fuente de nitrógeno, la fijación de nitrógeno en *Klebsiella* sólo tiene lugar en condiciones anóxicas.

ción covalente de la nitrogenasa reductasa, que produce una pérdida de la actividad enzimática. Cuando el amoníaco vuelve a ser factor limitante, esta proteína modificada se convierte en la forma activa y se reinicia la fijación de N_2. La regulación por amoníaco es, por tanto, un método rápido y reversible de control del consumo de ATP por la nitrogenasa. No todas las bacterias fijadoras de nitrógeno poseen el sistema conmutador, aunque está bastante extendido en ciertos grupos tales como, por ejemplo, las bacterias fototróficas, donde fue descubierto.

✓ 17.28-17.29 Revisión de conceptos

La fijación de nitrógeno, o reducción de N_2 a NH_3, comprende un complejo sistema enzimático llamado nitrogenasa, compuesto por la dinitrogenasa y la dinitrogenasa reductasa. La mayor parte de las nitrogenasas contienen molibdeno o vanadio y hierro como cofactores metálicos, y el proceso de fijación de nitrógeno requiere energía. La nitrogenasa y otras proteínas reguladoras asociadas están codificadas por el regulón *nif*. Algunos sustratos artificiales que son estructuralmente similares al N_2, como el acetileno y el cianuro, también son reducidos por la nitrogenasa. La fijación de nitrógeno y la nitrogenasa son dos procesos sometidos a una elevada regulación.

✓ Escríbase una ecuación igualada para la reacción que lleva a cabo la enzima *nitrogenasa*.

✓ ¿Qué es el *FeMo-co*?

✓ ¿Qué metales son necesarios para la fijación de nitrógeno?

✓ ¿Qué factores físicos y químicos afectan a la función de la nitrogenasa? ¿En qué difiere el sistema de la nitrogenasa de *Streptomyces thermoautotrophicus*?

✓ ¿Cómo afecta el amoníaco al proceso de fijación de nitrógeno?

Preguntas de repaso

1. ¿En qué clase nutricional situaría un organismo que usa *glucosa* como única fuente de carbono y energía? ¿Y si utiliza *azufre elemental* como fuente de energía? ¿Cómo denominaría a este último organismo si creciera con CO_2 como única fuente de carbono? ¿Cuál es la fuente de energía de los organismos *fototrofos*?
2. ¿Cuál es el papel de la luz en el proceso fotosintético de las bacterias verdes y rojas? ¿Y en el de las cianobacterias? Compárese el proceso fotosintético en estos dos grupos de procariotas.
3. ¿Cuáles son las funciones de las clorofilas captadoras de luz y de las del centro de reacción? ¿Por qué un mutante que es incapaz de producir clorofilas captadoras de luz (son mutantes que se pueden aislar en el laboratorio) no es buen competidor en la naturaleza?
4. ¿Dónde se localizan los pigmentos fotosintéticos en una bacteria roja? ¿Y en una cianobacteria? ¿Y en un alga verde? Considerando la función de los pigmentos clorofílicos, ¿por qué no se pueden localizar en otro lugar de la célula, por ejemplo, en el citoplasma o en la pared celular?
5. ¿Cómo es el proceso mediante el cual se obtiene ATP a partir de la luz en un organismo *fototrofo anoxigénico*? ¿En qué se parecen el flujo de electrones de la fotosíntesis y de la respiración? ¿En qué se diferencian?
6. ¿Cómo se obtiene poder reductor para el crecimiento autotrófico en una bacteria roja? ¿Y en una cianobacteria?
7. ¿En qué se diferencia el potencial de reducción de la clorofila *a* en el fotosistema I y en el fotosistema II? ¿Por qué el potencial de reducción de la clorofila del fotosistema II tiene que ser tan altamente electropositivo?

8. ¿Cuál es la principal función de los carotenoides y ficobilinas en los microorganismos fototrofos?
9. ¿Qué dos enzimas son exclusivas de los organismos que realizan el ciclo de Calvin? ¿Qué reacciones llevan a cabo? ¿Cuál sería la consecuencia en un mutante que careciera de cualquiera de estas enzimas?
10. Para la conversión de 6 moléculas de CO_2 en 1 molécula de fructosa se necesitan 18 moléculas de ATP. ¿Dónde se consumen estos ATPs en las reacciones del ciclo de Calvin?
11. ¿Qué organismos emplean el ciclo del hidroxipropionato o el ciclo inverso del ácido cítrico como vías autotróficas?
12. Compárese la utilización de H_2S por una bacteria fototrofa roja y una incolora del azufre como *Beggiatoa*. ¿Qué función desempeña el H_2S en el metabolismo de cada organismo?
13. Analícese por qué el rendimiento del crecimiento de *Thiobacillus ferrooxidans* (gramos de célula por mol de sustrato) es considerablemente mayor cuando el organismo crece aeróbicamente en azufre elemental en vez de en hierro ferroso como donador de electrones (se supone que en ambos casos el organismos crece de forma autotrofa).
14. En *Escherichia coli*, la síntesis de la enzima *nitrato reductasa* se reprime por el oxígeno. Teniendo en cuenta argumentos bioenergéticos, ¿a qué podría deberse la aparición de este fenómeno represivo en la evolución?
15. Coméntense tres diferencias importantes en la reducción *asimiladora* y *desasimiladora* del nitrato.
16. ¿Por qué es la hidrogenasa una enzima constitutiva de *Desulfovibrio*?
17. Compárese la reducción de hierro férrico con la decloración reductora basándose en (1) el producto de la reducción y (2) la importancia ecológica.
18. Compárense los organismos *homoacetógenos* con los *metanógenos* basándose en (1) los sustratos y productos de su metabolismo energético, (2) la capacidad de usar compuestos orgánicos como donadores de electrones en el metabolismo energético, (3) los mecanismos de autotrofia, y (4), la capacidad para crecer por respiración aeróbica (se recomienda consultar la Sección 13.4 antes de contestar a esta pregunta).
19. Defínase el término *fosforilación a nivel de sustrato*. ¿En qué difiere de la *fosforilación oxidativa*? Suponiendo que un organismo es facultativo, ¿qué condiciones nutricionales básicas determinan si el organismo obtiene energía a nivel de sustrato en vez de por fosforilación oxidativa?
20. Aunque muchos compuestos son fermentables teóricamente, para realizar un proceso fermentativo la mayor parte de los compuestos orgánicos deben ser convertidos en alguna de las moléculas que pertenecen a un grupo relativamente pequeño. ¿Qué moléculas son éstas y por qué deben producirse?
21. Si a un cultivo de *Escherichia coli* que está creciendo fermentativamente se le añade 1 g/l de $NaNO_3$, qué cabe esperar, ¿un aumento o una disminución del *rendimiento* del crecimiento del cultivo? ¿Por qué?
22. ¿Cómo se producen las fermentaciones en ausencia de fosforilación a nivel de sustrato?
23. ¿Por qué los hidrocarburos han acumulado grandes reservas en la Tierra a pesar de que en ciertas condiciones son fácilmente degradados por microorganismos?
24. ¿En qué se diferencia un *metanotrofo* de un *metanógeno*? ¿En qué difiere el patrón de asimilación de carbono en los metanotrofos del Tipo I y los del Tipo II?
25. ¿En qué se diferencian las *monooxigenasas* de las *dioxigenasas* en cuanto a las reacciones que catalizan?
26. Compárese la conversión de celulosa y almidón intracelular en unidades de glucosa. ¿Qué enzimas intervienen y qué proceso es el más eficiente en términos energéticos?
27. Escríbase la reacción catalizada por la enzima *nitrogenasa*. ¿Cuántos electrones se requieren en esa reacción? ¿Cuántos se usan realmente? Explíquese.
28. ¿Qué metales se encuentran en la nitrogenasa? ¿Son todas las nitrogenasas sensibles al oxígeno?
29. ¿En qué se diferencia la nitrogenasa de *Streptomyces thermoautotrophicus* de la de *Azotobacter*?

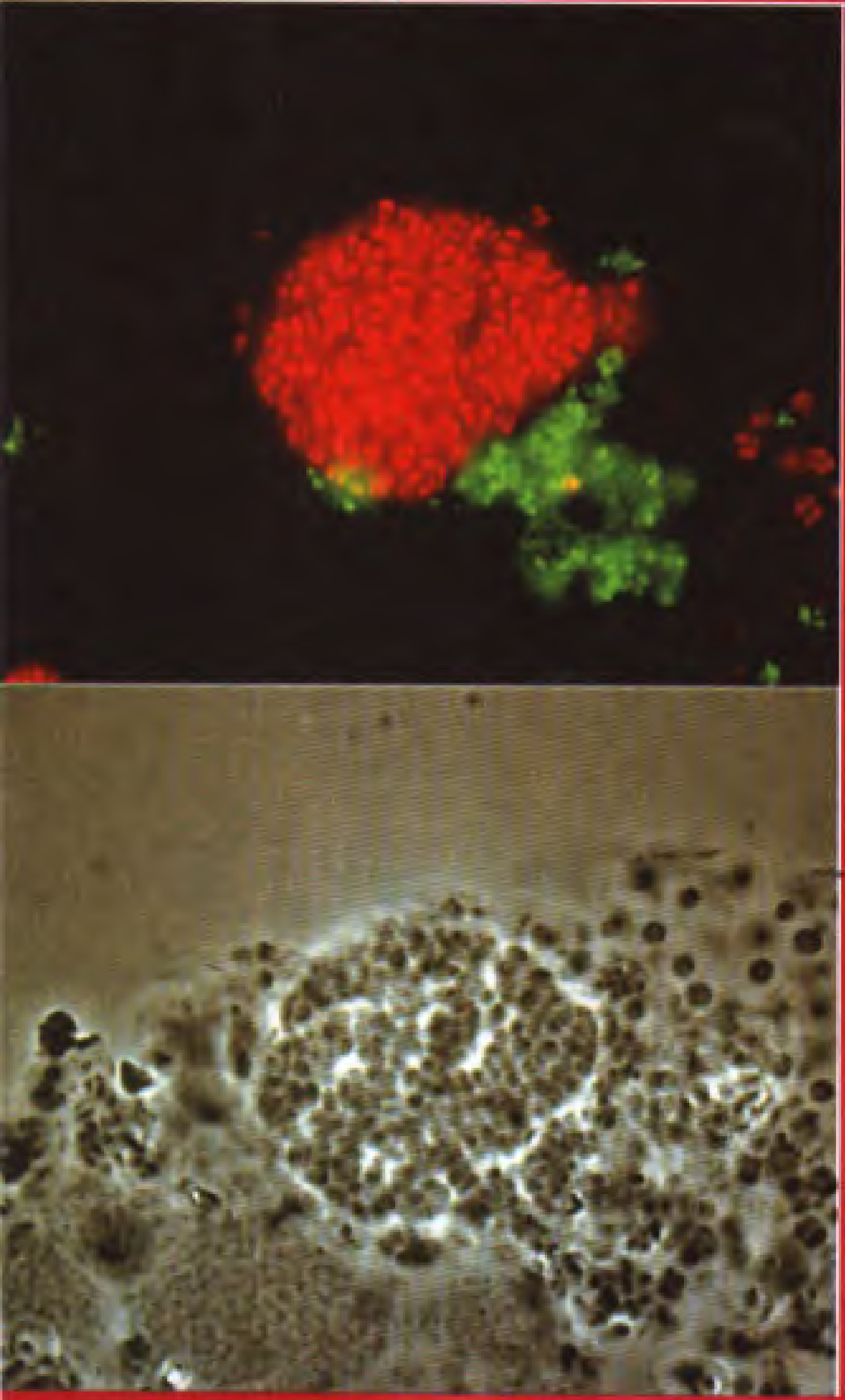
Ejercicios prácticos

1. Compárense los espectros de absorción de la clorofila *a* y de la bacterioclorofila *a*. ¿Qué longitudes de onda son absorbidas preferentemente por cada pigmento y cómo se corresponden las propiedades de absorción de estos pigmentos con las regiones del espectro visible? ¿Por qué la mayoría de las plantas son de color verde?
2. La velocidad de crecimiento de la bacteria fototrofa roja *Rhodobacter* es casi el doble cuando el organismo crece fototróficamente en un medio con malato como fuente de carbono que cuando lo hace con CO_2 como fuente de carbono (con H_2 como donador de electrones). Coméntense las razones e indique la clase nutricional en que situaría a *Rhodobacter* cuando crece en cada una de las dos condiciones.
3. Coméntense los datos obtenidos a partir de estudios sobre el proceso fotosintético de algunas cianobacterias que sostienen la hipótesis de que estos organismos evolucionaron a partir de fototrofos anoxigénicos.
4. Aunque los quimiolitotrofos y los quimioorganotrofos son fisiológicamente distintos, comparten varias características en cuanto a la producción de ATP. Coméntense estas propiedades comunes, junto con las razones por las que el rendimiento del crecimiento de un quimioorganotrofo (gramos de célula por mol de sustrato) que respira glucosa es mucho mayor que el rendimiento de un quimilitotrofo que respira azufre.
5. Explíquese por qué la siguiente afirmación es literalmente incorrecta: «La respiración anaeróbica es simplemente un proceso donde un aceptor de electrones alternativo sustituye al O_2 en el proceso respiratorio».
6. Cuando se produce metano a partir de CO_2 (más H_2), o a partir de metanol (en ausencia de H_2), se llevan a cabo varios de los pasos de la vía que se muestra en las Figuras 17.44 y 17.45. Compárese y contrástese la metanogénesis a partir de estos dos sustratos y comente por qué tienen que ser metabolizados en direcciones *opuestas.*
7. Aunque el dextrano es un polímero de glucosa, ésta no puede usarse para fabricar dextrano. ¿Por qué? ¿Cómo se relaciona la síntesis de dextrano con la higiene oral (*véase* Sección 21.3)?
8. *Pseudomonas fluorescens* crece aeróbicamente en benzoato, mientras que la bacteria fototrofa *Rhodopseudomonas palustris* puede crecer de forma anaeróbica en este medio. Compárese el metabolismo del benzoato en las dos especies teniendo en cuenta las siguientes consideraciones: requerimiento de oxigenasa, reacciones iniciales para la apertura del anillo y producto(s) formado(s) que entra(n) en las vías metabólicas centrales.

Los colorantes fluorescentes unidos a sondas de ácidos nucleicos que tienen como diana el RNA ribosómico se denominan colorantes filogenéticos. Estos colorantes penetran en las células y se unen a sus ribosomas. La especificidad de las sondas varía, yendo desde general a altamente específica. Esto permite distinguir los microorganismos presentes en un ecosistema bien de forma general, por ejemplo, los procariotas del dominio *Bacteria* o *Archaea*, bien con más detalle, esto es, posibilita la distinción entre diferentes géneros de un linaje filogenético particular. Aquí se muestran dos tipos de bacterias nitrificantes que forman gránulos en las aguas residuales. Los organismos están estrechamente relacionados, pero son lo suficientemente distinguibles para que sólo una de las dos sondas del RNA ribosómico, una marcada con un colorante rojo y la otra con uno verde, se una a cada población de células. Los ecólogos microbianos pueden explotar estas diferencias genéticas para identificarlas y rastrearlas en ecosistemas microbianos naturales.

18

MÉTODOS DE ECOLOGÍA MICROBIANA



I ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS BASADOS EN TÉCNICAS DE CULTIVO 607
18.1 Enriquecimiento y aislamiento 607
18.2 Aislamiento en cultivo axénico 611
II ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS 613
18.3 Viabilidad y cuantificación mediante técnicas de tinción 613
18.4 Tinciones genéticas 615
18.5 PCR: relacionando genes específicos con organismos específicos 617
III MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD MICROBIANA EN LA NATURALEZA 620
18.6 Radioisótopos y microelectrodos 620
18.7 Isótopos estables 621

Glosario

Columna de Winogradsky una columna compactada con lodo y cubierta con agua para imitar un lago, donde diversas bacterias se desarrollan en un periodo de meses

Cultivo de enriquecimiento método de obtención de cultivos de laboratorio de microorganismos a partir de una muestra natural por medio de cultivos altamente selectivos

DAPI (4′,6-diamino-2-fenilindol) colorante fluorescente inespecífico para la tinción de bacterias en muestras naturales

Ecología microbiana estudio de la interacción de los microorganismos entre sí y con el medio.

Electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente (DGGE) técnica electroforética que puede separar fragmentos de ácido nucleico del mismo tamaño pero de distinta secuencia

Fraccionamiento isotópico discriminación por las enzimas de los isótopos *más pesados* de los diversos isótopos de C, S, etc., lo que lleva al enriquecimiento de isótopos más ligeros durante el metabolismo de CO_2, SO_4^{2-}, etc.

Hibridación fluorescente in situ (FISH) método que emplea un colorante fluorescente incorporado a una sonda nucleotídica específica para la identificación o rastreo de microorganismos en el ambiente

Microelectrodo electrodo pequeño de cristal para medir el pH o compuestos específicos, O_2, H_2S, etc., que se pueden introducir en un hábitat microbiano a intervalos de microescala

Número más probable (NMP) dilución seriada de una muestra natural para determinar la mayor dilución que produce crecimiento

Pinzas de láser instrumento para obtener cultivos axénicos mediante el cual una célula individual puede ser atrapada con un haz de láser y separarse de las células circundantes para ponerla en un medio de cultivo estéril

Sesgo en el enriquecimiento problema relacionado con el cultivo de enriquecimiento, donde los resultados se desvían por el aislamiento de especies minoritarias en detrimento de organismos de mayor abundancia y significado ecológico en un hábitat

Sondas de ácidos nucleicos un oligonucleótido, generalmente de 10 a 20 bases de longitud, complementario de la secuencia de bases de una secuencia del gen diana

En este capítulo empezamos el estudio de la **ecología microbiana**. Igual que la ecología general, la ecología microbiana trata de la interacción de los organismos, en nuestro caso los microorganismos, entre sí y con su ambiente. Los ecólogos microbianos se dedican principalmente a dos áreas de estudio: (1) la *biodiversidad*, que incluye el aislamiento, identificación y cuantificación de microorganismos en hábitat diversos, y (2) la *actividad microbiana*, es decir, lo que los microorganismos *hacen* en sus hábitat.

En este capítulo trataremos la metodología de la ecología microbiana (cómo los ecólogos microbianos evalúan la biodiversidad y la actividad microbiana en un hábitat determinado). Estos métodos comprenden el *enriquecimiento* y el *aislamiento*, los métodos de *tinción de células*, tanto específicos como inespecíficos, el *aislamiento* y *caracterización* de genes, y la medición de las *actividades* de microorganismos *in situ* (en el medio natural). En el Capítulo 19, se discute la ecología de comunidades microbianas a gran escala (por ejemplo, del suelo y del agua) y otros hábitat microbianos más especializados (por ejemplo, el rumen y los nódulos radicales de las leguminosas).

I ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS BASADOS EN TÉCNICAS DE CULTIVO

En las dos próximas secciones vamos a considerar la forma en la que los microbiólogos aíslan los microorganismos de la naturaleza. Este proceso consiste en separar los organismos de interés de una comunidad microbiana, un procedimiento que se conoce como *enriquecimiento*, y que permite aislarlos después en un cultivo axénico. El aislamiento es importante porque se obtienen cultivos para estudios detallados y controlados de laboratorio y para su aplicación en biotecnología y en microbiología ambiental e industrial.

18.1 Enriquecimiento y aislamiento

En un ambiente natural no es frecuente encontrar un solo tipo de microorganismo. Lo que existen son *comunidades microbianas*, y el desarrollo de métodos y procedimientos que permitan el aislamiento y cultivo de microorganismos de interés es un reto para el ecólogo microbiano. El enfoque más corriente para alcanzar este propósito es la **técnica del cultivo de enriquecimiento**. Este método requiere que el medio de cultivo y las condiciones de incubación sean *selectivos* para el organismo que se desea aislar y *contraselectivos* para los organismos no deseados. Por tanto, necesitamos reproducir lo más fielmente posible los recursos y las condiciones que se dan en este nicho ecológico y buscar luego los habitantes potenciales de aquel hábitat capaces de desarrollarse en las condiciones de enriquecimiento seleccionadas. La Tabla 18.1 ofrece una visión de conjunto de algunos procedimientos usados para lograr medios de enriquecimiento adecuados.

Para que un cultivo de enriquecimiento tenga éxito es necesario contar con un *inóculo* apropiado (una muestra que contenga el microorganismo). Por tanto, la metodología del cultivo de enriquecimiento se inicia con la elección del hábitat adecuado (*véase* Tabla 18.1). El cultivo de enriquecimiento suele establecerse sembrando el inóculo directamente en un medio altamente selectivo; muchos de los procariotas más frecuentes pueden aislarse de esta manera. Por ejemplo, el gran microbiólogo holandés Martinus Beijerinck, a quien se deben las primeras técnicas de cultivo

TABLA 18.1 Algunos métodos de cultivo de enriquecimiento para procariotas[a]

Bacterias fototróficas con luz: principal fuente de C y CO_2

Incubación en presencia de aire	**Microorganismos enriquecidos**	**Inóculo**
N_2 como fuente de nitrógeno	Cianobacterias	Aguas de charca o lacustres; lodos ricos en sulfuro; aguas estancadas; aguas residuales sin tratar; lecho de hojas descompuestas y húmedas; suelos húmedos expuestos a la luz y suelo pasteurizado (heliobacterias)
NO_3^- como fuente de nitrógeno, 55°C	Cianobacterias termófilas	Tapete microbiano de fuentes termales
Incubación anóxica		
H_2 o ácidos orgánicos; N_2 como única fuente de nitrógeno	Bacterias rojas no del azufre, heliobacterias	
H_2S como donador de electrones	Bacterias rojas y verdes del azufre	

Bacterias quimiolitotróficas sin luz: principal fuente de C y CO_2 (el medio debe carecer de C orgánico)

Incubación en presencia de aire: respiración aeróbica			
Donador de electrones	**Aceptor de electrones**	**Microorganismos enriquecidos**	**Inóculo**
NH_4^+	O_2	Bacterias nitrosificantes (*Nitrosomonas*)	Suelo, lodo y aguas residuales
NO_2^-	O_2	Bacterias nitrificantes (*Nitrobacter*)	
H_2	O_2	Bacterias del hidrógeno (varios géneros)	
H_2S, S^0, $S_2O_3^{2-}$	O_2	*Thiobacillus* spp.	
Fe^{2+}, pH bajo	O_2	*Thiobacillus ferrooxidans*	
Incubación anóxica			**Inóculo**
S^0, $S_2O_3^{2-}$	NO_3^-	*Thiobacillus denitrificans*	Lodo, sedimentos de lago y suelo
H_2	NO_3^- +extracto de levadura	*Paracoccus denitrificans*	

Bacterias quimioorganotróficas sin luz y metanógenos: principal fuente de C, compuestos orgánicos

Incubación en presencia de aire: respiración aeróbica			
Donador de electrones y fuente de nitrógeno	**Aceptor de electrones**	**Microorganismos típicos enriquecidos**	**Inóculo**
Lactato + NH_4^+	O_2	*Pseudomonas fluorescens*	Suelo, lodo, sedimentos de lagos y vegetación en descomposición; inóculo pasteurizado (80°C durante 15 min) para todos los enriquecimientos de *Bacillus*
Benzoato + NH_4^+	O_2	*Pseudomonas fluorescens*	
Almidón + NH_4^+	O_2	*Bacillus polymyxa* y otros *Bacillus* spp.	
Etanol (4%) + 1% extracto de levadura, pH 6.0	O_2	*Acetobacter* y *Gluconobacter*	
Urea (5%) + 1% extracto de levadura	O_2	*Sporosarcina ureae*	
Hidrocarburos (p. ej., aceite mineral, gasolina y tolueno) + NH_4^+	O_2	*Mycobacterium*, *Nocardia* y *Pseudomonas* (*véase* Figura 19.45)	
Celulosa + NH_4^+	O_2	*Cytophaga* y *Sporocytophaga* (*véase* Figura 12.90)	
Manitol o benzoato, N_2 como fuente de N	O_2	*Azotobacter*	

de enriquecimiento (*véase* Sección 1.6), aisló por primera vez la bacteria fijadora de nitrógeno *Azotobacter* por medio de lo que después se convirtió en una estrategia clásica de enriquecimiento (*véase* Figura 18.1). Como *Azotobacter* puede crecer rápidamente fijando N_2 del aire, los medios de enriquecimiento carentes de amoníaco u otras formas de nitrógeno fijado son muy selectivos para este organismo; las bacterias no fijadoras de nitrógeno o las bacterias fijadoras de nitrógeno anaeróbicas son contraseleccionadas con este método (*véase* Figura 18.1)

Literalmente, son centenares los métodos que se han ideado para los cultivos de enriquecimiento; algunos de los más seguros aparecen en la Tabla 18.1. Deseamos recalcar que *tanto* el medio de cultivo *como* las condiciones de incubación son críticos para que tenga éxito un cultivo de enriquecimiento; es decir, deben optimizarse tanto los *recursos*

TABLA 18.1 Algunos métodos de cultivo de enriquecimiento para procariotas[a] (*continuación*)

Incubación anóxica: respiración anaeróbica

Principales ingredientes	Aceptor de electrones	Microorganismos enriquecidos	Inóculo
Ácidos orgánicos	KNO_3(0,2%)	*Pseudomonas* (especies desnitrificantes)	Suelo, lodo y sedimentos lacustres
Extracto de levadura	KNO_3(1%)	*Bacillus* (especies desnitrificantes)	
Ácidos orgánicos	Na_2SO_4	*Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*	
Acetato, propionato y butirato	Na_2SO_4	Sulfato reductores que oxidan ácidos grasos	Como los anteriores; digestores de aguas residuales y contenido del rumen
Acetato y etanol	S^0	*Desulfuromonas*	
Acetato	Fe^{3+}	*Geobacter* y *Geospirillum*	
Acetato	ClO_3^-	Varias bacterias reductoras de clorato	
H_2	Na_2CO_3	Metanógenos (sólo especies quimiolitotrofas) y homoacetógenos	Lodo, sedimentos y aguas residuales
CH_3OH	Na_2CO_3	*Methanosarcina barkeri*	
CH_3NH_2	KNO_3	*Hyphomicrobium*	

Incubación anóxica: fermentación

Donador de electrones y fuente de nitrógeno	Aceptor de electrones	Microorganismos enriquecidos	Inóculo
Glutamato o histidina	No se añade ningún aceptor de electrones exógeno	*Clostridium tetanomorphum*	Lodo, sedimentos lacustres y material vegetal en descomposición; productos lácteos (bacterias del ácido láctico y propiónico) y contenido del rumen o intestinal (bacterias entéricas) y fangos de aguas residuales; suelo
Almidón + NH_4^+	Ninguno	*Clostridium* spp.	
Almidón y N_2 como fuente de N	Ninguno	*Clostridium pasteurianum*	
Lactato + extracto de levadura	Ninguno	*Veillonella* spp.	
Glucosa o lactosa + NH_4^+	Ninguno	*Escherichia*, *Enterobacter* y otros organismos fermentadores	
Glucosa + extracto de levadura (pH 5)	Ninguno	Bacterias del ácido láctico (*Lactobacillus*)	
Lactato + extracto de levadura	Ninguno	Bacterias del ácido propiónico	
Succinato + NaCl	Ninguno	*Propionigenium*	
Oxalato	Ninguno	*Oxalobacter*	

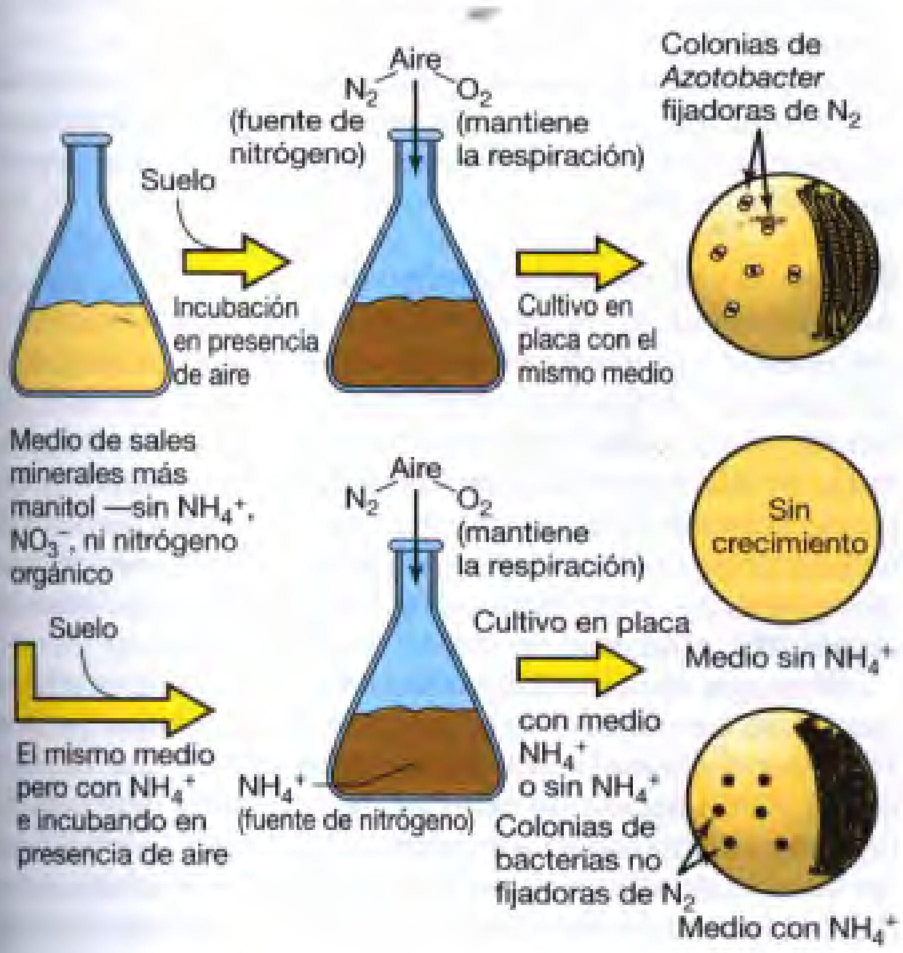
[a] Todos los medios tienen que contener diversas sales minerales, incluyendo N, P, S, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Ca^{2+} y otros oligoelementos (*véanse* Secciones 5.1-5.3). Esta tabla constituye una perspectiva de los métodos de enriquecimiento y no considera el efecto que la temperatura de incubación pueda tener en el aislamiento de especies termófilas (temperatura elevada), hipertermófilas (temperatura muy elevada) y psicrófilas (temperatura baja), o en los efectos del pH o salinidad extremos, suponiendo que se dispone de un inóculo apropiado.

como las *condiciones* para tener las mejores posibilidades de enriquecer el microorganismo que interesa.

La columna de Winogradsky

Tradicionalmente, la **columna de Winogradsky** se ha utilizado en el cultivo de enriquecimiento para el aislamiento de bacterias fototróficas rojas y verdes, de bacterias sulfato reductoras y de muchos otros anaerobios (*véase* Figura 18.2). El nombre corresponde al famoso microbiólogo ruso Sergei Winogradsky (*véase* el Cuadro de texto «Winogradsky y la quimiolitotrofia» en el Capítulo 17 y la Sección 1.6), quien utilizó la columna por primera vez a finales del siglo XIX para estudiar microorganismos del suelo. La columna de Winogradsky es un ecosistema anóxico en miniatura que puede usarse como suministro a largo plazo de bacterias para cultivos de enriquecimiento.

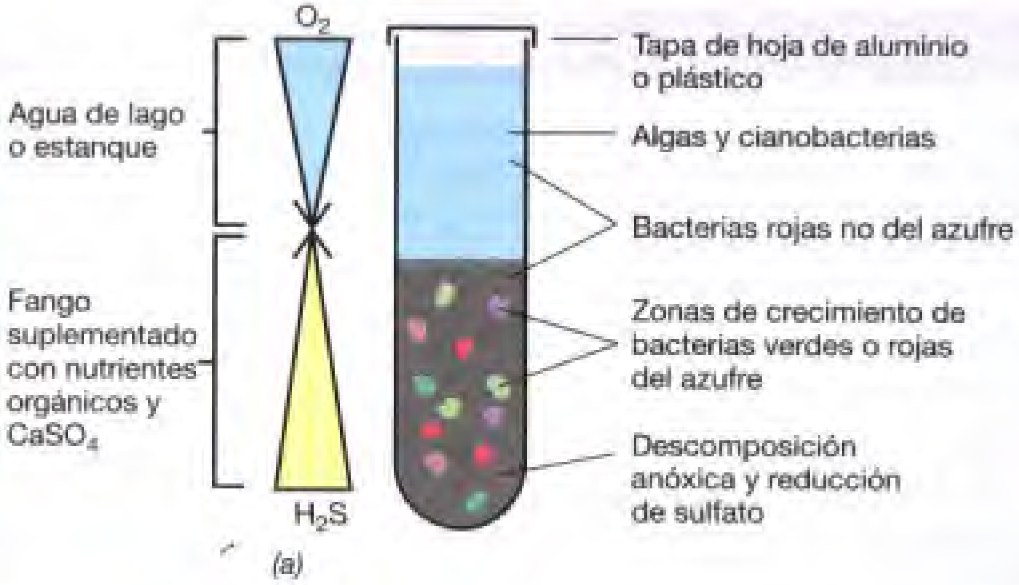
La columna de Winogradsky se prepara con un cilindro de vidrio grande que se llena aproximadamente hasta la

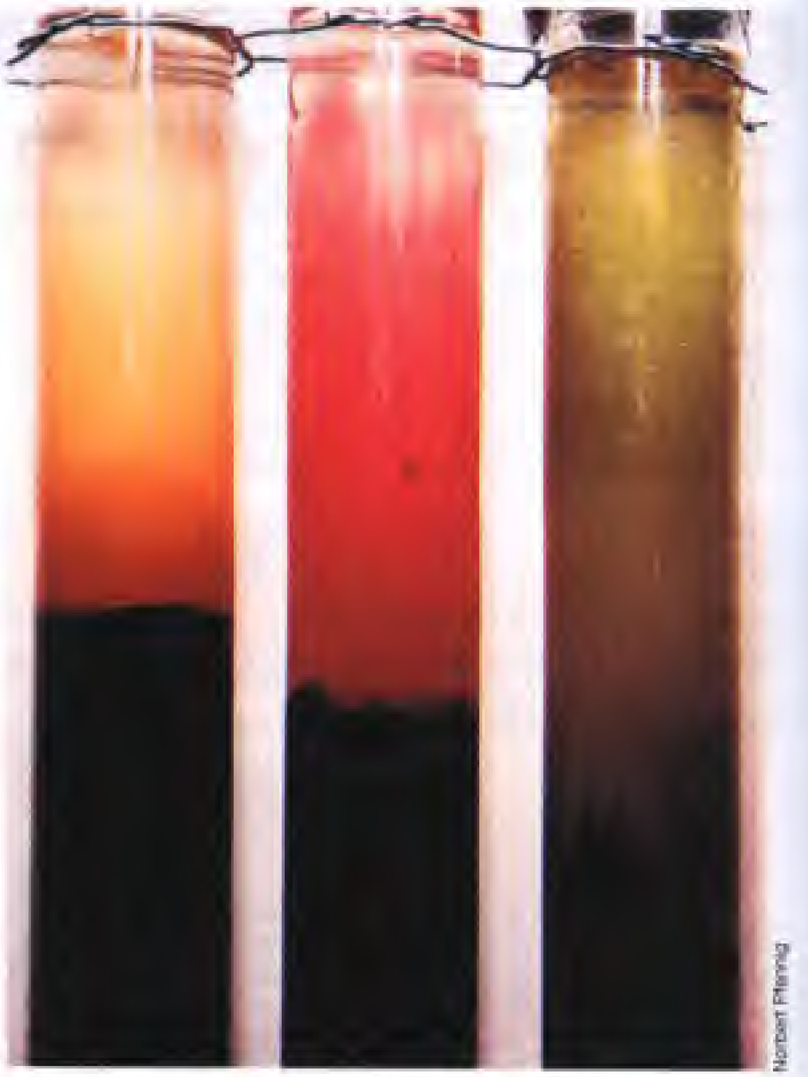


Aire
N_2
(fuente de nitrógeno)
O_2
(mantiene la respiración)
Colonias de *Azotobacter* fijadoras de N_2
Suelo
Incubación en presencia de aire
Cultivo en placa con el mismo medio
Medio de sales minerales más manitol —sin NH_4^+, NO_3^-, ni nitrógeno orgánico
Aire
N_2
O_2
(mantiene la respiración)
Sin crecimiento
Suelo
Cultivo en placa
Medio sin NH_4^+
con medio NH_4^+ o sin NH_4^+
El mismo medio pero con NH_4^+ e incubando en presencia de aire
NH_4^+
(fuente de nitrógeno)
Colonias de bacterias no fijadoras de N_2
Medio con NH_4^+

Figura 18.1 Aislamiento de *Azotobacter*. La selección de bacterias aeróbicas reductoras de N_2 da por lo general especies de *Azotobacter* o relacionadas. Por el contrario, el enriquecimiento con formas fijadas de nitrógeno como NH_4^+ raramente produce bacterias fijadoras de N_2.

Oxidación y reducción
TUTORÍA


O_2
Agua de lago o estanque
Fango suplementado con nutrientes orgánicos y $CaSO_4$
H_2S
Tapa de hoja de aluminio o plástico
Algas y cianobacterias
Bacterias rojas no del azufre
Zonas de crecimiento de bacterias verdes o rojas del azufre
Descomposición anóxica y reducción de sulfato
(a)



Norbert Pfennig

Figura 18.2 Columna de Winogradsky. (a) Esquema de una columna típica. La columna se coloca de manera que reciba luz solar débil. Las bacterias quimioorganotróficas crecen a lo largo de toda la columna, los aerobios y microaerófilos en la parte superior, los anaerobios en las zonas que contienen H_2S. La descomposición anóxica que da lugar a la reducción de sulfato crea el gradiente de H_2S. Las bacterias verdes y rojas del azufre se estratifican de acuerdo con la tolerancia al H_2S. (b) Foto de columnas de Winogradsky que se han mantenido anóxicas hasta la parte superior; obsérvese el crecimiento masivo de tres tipos diferentes de bacterias fototróficas en la parte de la columna de agua que está encima del lodo. De izquierda a derecha: *Thiospirillum jenense*, *Chromatium okenii* (ambas bacterias rojas del azufre, Sección 12.2) y *Chlorobium limicola* (bacteria verde del azufre, *véase* Sección 12.32).

mitad con lodo rico en materia orgánica, y que preferiblemente contenga sulfuro (*véase* Figura 18.2). Los sustratos de carbono se mezclan previamente con el lodo; éstos determinarán qué organismos serán enriquecidos, pero deben evitarse los sustratos fácilmente fermentables (que pueden llevar a una formación excesiva de gas). Al lodo se le añade $CaCO_3$ y $CaSO_4$ como tampón y como fuente de sulfato, respectivamente. El lodo se compacta en el envase, cuidando de no atrapar aire (*véase* Figura 18.2). El lodo se cubre con agua de un lago, embalse o acequia (o agua de mar si se prepara una columna marina), y se tapa el cilindro para evitar la evaporación. Se coloca el cilindro cerca de una ventana donde reciba luz solar atenuada y se deja durante varias semanas.

En una columna de Winogradsky típica se desarrolla una mezcla de organismos. Las algas y cianobacterias ocupan rápidamente la parte superior y al producir O_2 ayudan a mantener esta zona óxica. El proceso de descomposición en el sedimento lleva rápidamente a la producción de ácidos orgánicos, alcoholes y H_2, sustratos adecuados para las bacterias sulfato reductoras (*véanse* Secciones 12.18, 17.15 y 19.13). El sulfuro producido por las bacterias sulfato reductoras provoca el crecimiento de bacterias rojas y verdes del azufre (fototrofos anoxigénicos, *véanse* Secciones 12.2 y 12.33). Estos organismos aparecen generalmente como zonas de crecimiento en el lodo de la columna, pero también pueden desarrollarse profusamente en el agua si los fototrofos oxigénicos son escasos (*véase* Figura 18.2). Para el muestreo de bacterias fototróficas de la columna se introduce una pipeta larga con la que se recoge un poco de lodo o agua coloreados. Estas muestras se pueden usar para microscopía y para inocular medios de enriquecimiento para aislamiento y caracterización (Tabla 18.1).

La columna de Winogradsky se ha usado para enriquecer diversos procariotas, tanto aerobios como anaerobios. Además de producir un inóculo listo para un cultivo de enriquecimiento, a la columna también se le puede añadir un compuesto particular para probar la hipótesis de si en el inóculo existe uno o varios organismos que pueden degradarlo. Una vez que se ha establecido un enriquecimiento, se puede intentar hacer cultivos axénicos, tal como se discute en la Sección 18.2.

Sesgo en el enriquecimiento

Aunque el cultivo de enriquecimiento es una herramienta poderosa, en muchos casos se produce un sesgo en el enriquecimiento. En los cultivos líquidos de enriquecimiento típicos, el organismo más adaptado a las condiciones escogidas puede convertirse en la población dominante. Desgraciadamente, el organismo mejor adaptado en los cultivos de laboratorio a menudo es sólo un componente minoritario del ecosistema microbiano, en lugar de ser el mayoritario o el más relevante desde el punto de vista ecológico.

El **sesgo en el enriquecimiento** puede demostrarse cuando se comparan los métodos de dilución (*véase* Sección 18.2) con el clásico enriquecimiento en líquido. La dilución del inóculo seguida de un enriquecimiento, a menudo da lugar a un organismo diferente que cuando se enriquece un inóculo sin diluir. Se cree que la dilución elimina aquellas poblaciones minoritarias pero de rápido crecimiento, dando de este modo la oportunidad de desarrollarse a otros miembros de la comunidad. Por tanto, la dilución del inóculo es una práctica común en el cultivo de enriquecimiento en la microbiología actual.

✓ 18.1 Revisión de conceptos

El cultivo de enriquecimiento es un medio de obtención de microorganismos a partir de muestras naturales. Se pueden investigar reacciones específicas por este procedimiento escogiendo los medios y las condiciones de incubación selectivos para unos microorganismos determinados.

- ✓ Descríbase en qué se basa el enriquecimiento para aislar *Azotobacter* propuesto por Beijerinck.
- ✓ ¿Por qué se añade sulfato (SO_4^{2-}) a la columna de Winogradsky?
- ✓ ¿Qué es el *sesgo en el enriquecimiento*?

18.2 Aislamiento en cultivo axénico

Los cultivos axénicos (o «puros») se pueden obtener de muchas maneras a partir de un enriquecimiento; los métodos empleados más frecuentemente son la siembra por estría en superficie (en placa de Petri), la siembra en profundidad (*agar-shake*) y la dilución en líquido. Para aquellos microorganismos que crecen bien en medio de cultivo sólido (con agar), el método de elección es la siembra por estría (*véase* Figura 18.3*a*). A partir de una población mixta, mediante la siembra por estría se obtienen colonias separadas; repitiendo esta técnica con una de estas colonias aisladas se consigue un cultivo axénico, que puede ser transferido a un medio líquido. Las placas sembradas de este modo e incubadas en las condiciones adecuadas (por ejemplo, una jarra anóxica para anaerobios, *véase* Sección 6.13) nos permiten aislar tanto microorganismos aerobios como anaerobios.

Siembra en profundidad y número más probable (NMP)

El método de siembra en profundidad consiste en la dilución de un cultivo mixto en tubos de agar fundido; cuando el agar solidifica, las colonias se desarrollan *embebidas* en el tubo de agar en vez de en la superficie, como ocurre en la siembra por estría en placa (Figura 18.3*b*). Es un método de gran utilidad para purificar determinados tipos de microorganismos anaerobios, por ejemplo, las bacterias fototróficas del azufre y sulfato reductoras de las columnas de Winogradsky (*véase* Figura 18.2). Es posible obtener cultivos axénicos mediante diluciones sucesivas de una suspensión de células en tubos de agar fundido (Figura 18.3*b*). A partir de una colonia crecida en el tubo de mayor dilución utilizada como inóculo, se puede volver a hacer otro banco de diluciones, de tal manera que se acabe obteniendo un cultivo axénico.

Un procedimiento similar sin usar agar es la dilución seriada de un inóculo en un medio líquido hasta que el tubo o tubos finales de la serie no muestran crecimiento (*véase* Figura 18.4). Utilizando diluciones seriadas de diez en diez, por ejemplo, el último tubo que muestre crecimiento tiene que haberse originado a partir de 10 células o menos. Si se repite varias veces este proceso se obtienen cultivos axénicos. Esta técnica se conoce como la técnica del *número más probable* (NMP) (*véase* Figura 18.4), y se ha usado para estimar el número de microorganismos en alimentos, aguas residuales y en otras muestras donde hay que evaluar rutinariamente el número de células. Se puede hacer con medios altamente selectivos y condiciones de incubación dirigidos a uno o a un pequeño grupo de organismos, como por ejemplo un determinado patógeno, o usando un medio complejo para obtener una estimación del número total de células.

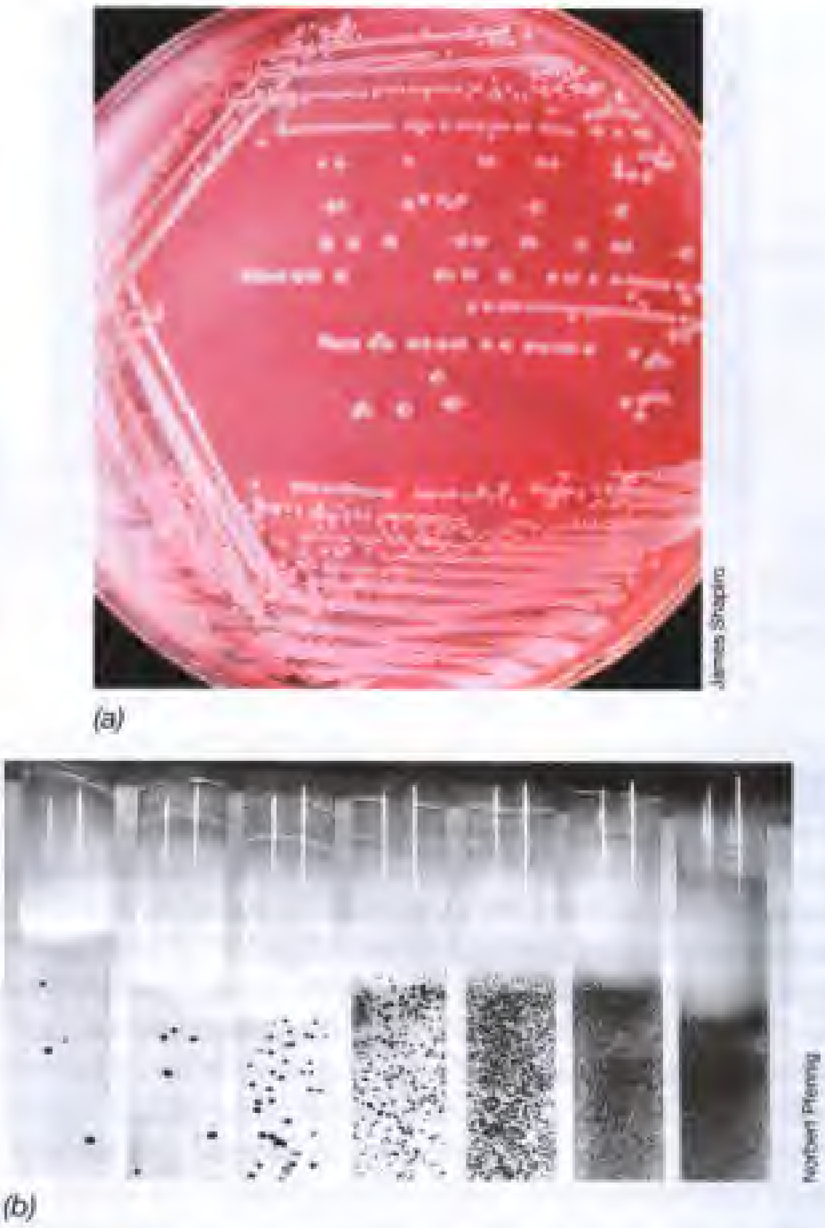


Figura 18.3 Métodos de cultivo axénico. (a) Los microorganismos que forman colonias en placas como las que se muestran aquí son por lo general muy fáciles de purificar. Para el aislamiento de microorganismos anaerobios aerotolerantes se pueden utilizar placas de Petri estándar, pero incubadas en condiciones anóxicas inmediatamente después de la siembra en estría. (b) Para el aislamiento de microorganismos anaerobios estrictos, sensibles al oxígeno, se utiliza la técnica de siembra en profundidad en tubo. De derecha a izquierda se muestran las sucesivas diluciones que han dado lugar a colonias aisladas. Los tubos están sellados con una mezcla de parafina y aceite mineral estériles para mantener la anoxia.

Con independencia del método utilizado para purificar el cultivo, una vez obtenido un supuesto cultivo axénico es esencial comprobar su pureza. Se utiliza para ello una combinación de técnicas microscópicas, observación de las características de la colonia en placas, o en siembras en profundidad en tubo, y comprobación del crecimiento en

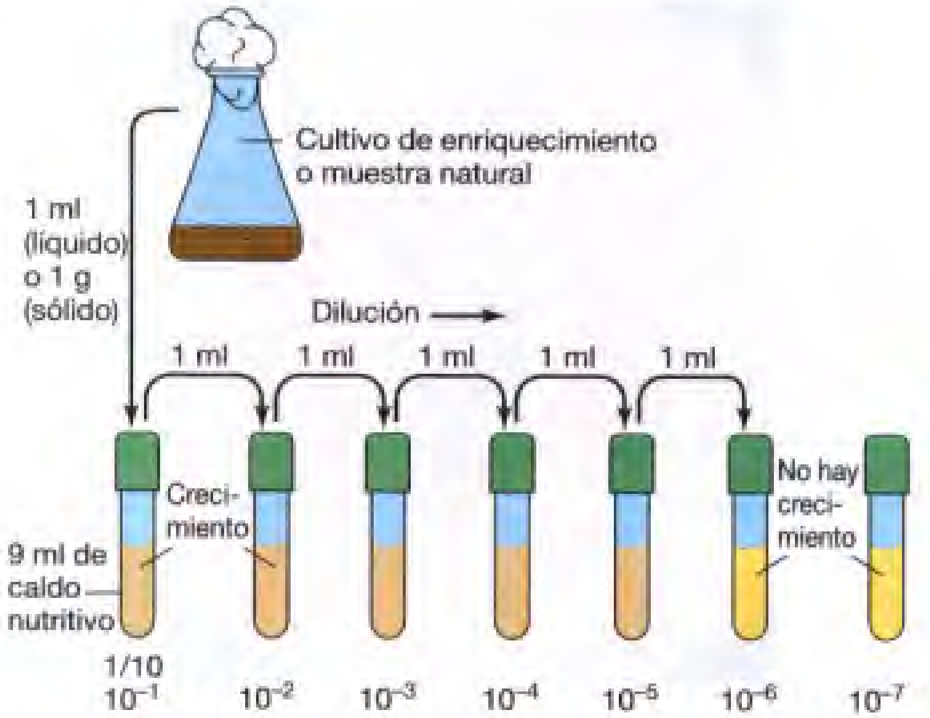


Figura 18.4 Procedimiento de enriquecimiento por «dilución de extinción» o análisis del número más probable (NMP). A un medio de cultivo selectivo se le añade un cultivo de enriquecimiento o una muestra natural de agua, suelo, etc., y se hace un banco de dilución. El último tubo que muestra crecimiento (en el ejemplo es la dilución 10^{-5}) debe de haberse desarrollado a partir de 10 células o menos. Para obtener cultivos axénicos se usa como inóculo la mayor dilución que muestre crecimiento y se repite el procedimiento. Para una estimación del número de un tipo determinado de bacterias de una muestra, el número más probable se define como la dilución más elevada que muestra crecimiento. Si el medio utilizado fuera muy selectivo para bacterias reductoras de sulfato, por ejemplo, se podría concluir que hay entre 10^{-5}-10^{-6} células recuperables de ese organismo por gramo de muestra. El empleo de varios tubos replicados por cada dilución proporciona mayor exactitud en el NMP final obtenido.

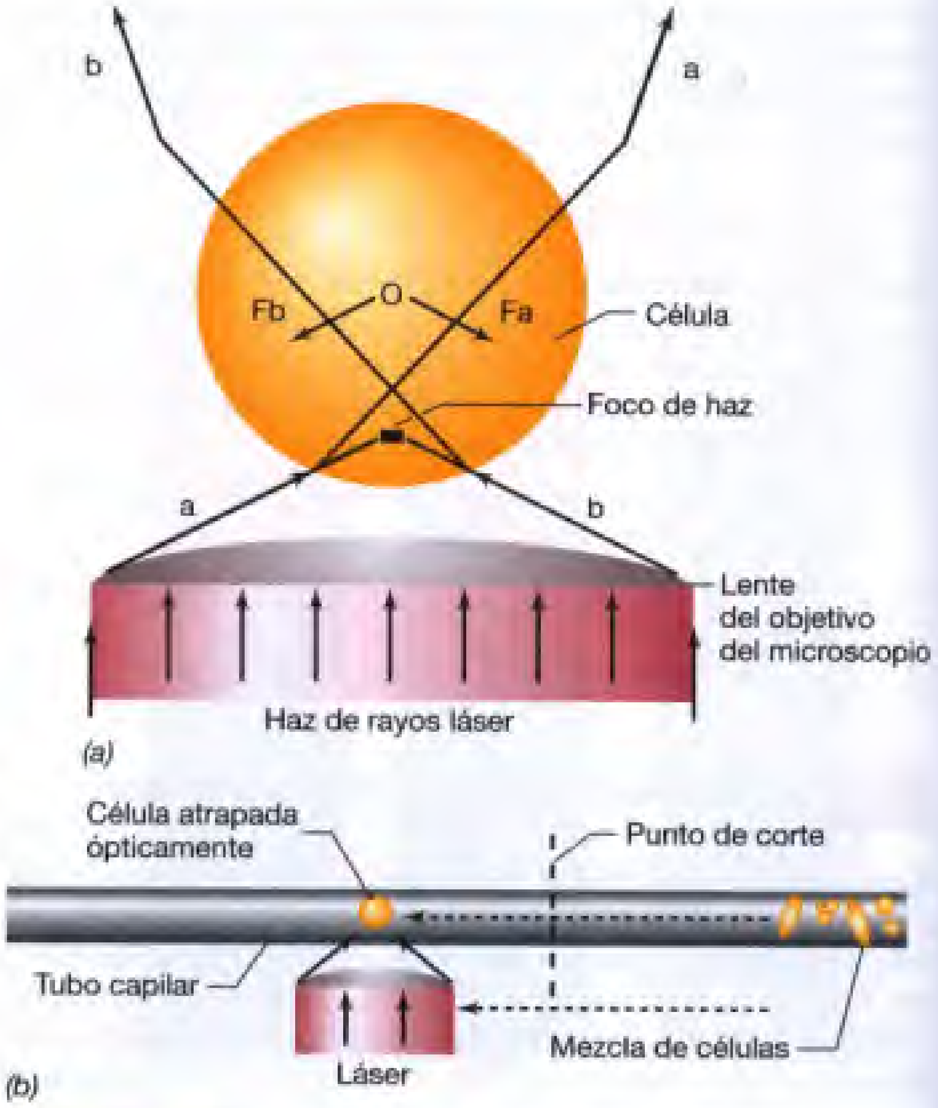


Figura 18.5 Pinzas de láser para el aislamiento de bacterias. (a) Principio de las pinzas ópticas. Un haz de rayos láser fuertemente enfocado sobre un objeto tan pequeño como una célula bacteriana, crea fuerzas de radiación descendentes (F_a, F_b) sobre la célula, que permiten su desplazamiento en cualquier dirección mientras esté sometida a la fuerza del haz de rayos láser. (b) Aislamiento. El haz de rayos láser puede enfocarse sobre una célula individual presente en la mezcla de un tubo capilar, atraparla ópticamente y separarla (en el ejemplo, la célula elegida se desplaza de derecha a izquierda) de las otras células. Una vez que esa célula se ha separado lo suficiente de las otras, se corta el capilar, se desconecta el láser y la célula se coloca en un tubo de medio estéril.

medios donde el microorganismo que nos interesa aislar crece muy poco, pero que favorecen el crecimiento de los microorganismos acompañantes. La observación microscópica de un solo tipo morfológico de célula, junto con unas características uniformes de la colonia y ausencia de contaminación en test con diversos medios de cultivo, puede tomarse como prueba de que un cultivo es *axénico* (puro).

Cultivos axénicos de alta tecnología: las pinzas de láser

Además de los métodos clásicos descritos, los avances tecnológicos han permitido la utilización de nuevas herramientas para la obtención de cultivos axénicos; una de ellas son las **pinzas (ópticas) de láser**.

Las pinzas de láser consisten en un microscopio óptico invertido equipado con un láser infrarrojo enfocado con precisión y un instrumento de micromanipulación (*véase* Figura 18.5). Una célula individual del campo de visión es atrapada por el haz de rayos láser y separada del resto de microorganismos. La célula queda atrapada porque la fuerza creada por el láser empuja hacia abajo los objetos pequeños (como las células microbianas) y los mantiene en el lugar; cuando el haz de láser se desplaza, las células atrapadas se mueven junto con él. Si la muestra está en un tubo capilar, se atrapa una única célula que después se aísla rompiendo el tubo en un punto entre la célula y el resto de la población. La célula recogida se introduce entonces en un tubo pequeño de medio estéril para iniciar su crecimiento como un cultivo axénico (*véase* Figura 18.5).

La tecnología de pinzas de láser es especialmente útil para el aislamiento de bacterias de desarrollo lento, que pueden ser superadas por el desarrollo rápido de otras poblaciones en los cultivos de enriquecimiento típicos, o para los organismos presentes en números tan bajos que podrían perderse con los métodos de enriquecimiento a partir de dilución. Y, junto con el uso de tinciones específicas capaces de identificar organismos determinados en un campo del microscopio (*véase* Sección 18.4), las pinzas de láser se emplean para seleccionar organismos a partir de una mezcla para su purificación y posterior estudio en el laboratorio.

✓ 18.2 Revisión de conceptos

A partir de un cultivo de enriquecimiento, se puede obtener un cultivo axénico mediante diversos procedimientos microbiológicos convencionales, entre ellos, la siembra en estría por agotamiento en placa, la siembra en profundidad y las diluciones seriadas. Las pinzas de láser permiten «atrapar» una célula de un campo microscópico y alejarla de otros microorganismos acompañantes.

- ✓ ¿En qué se diferencian los métodos de siembra en profundidad y de siembra en estría para el aislamiento de colonias?
- ✓ En la técnica del NMP (*véase* Figura 18.4), dígase por qué el número real de células por muestra probablemente estará entre el recíproco de la dilución más elevada que muestra crecimiento y la siguiente dilución.
- ✓ ¿Cómo se puede aislar una bacteria de morfología singular presente en números relativamente bajos en un cultivo de enriquecimiento?

II ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS

Los ecólogos microbianos con frecuencia quieren cuantificar las células de un hábitat microbiano, o conocer qué clase de organismos están presentes y en qué número. Esta información proporciona detalles de la dinámica de un ecosistema y de los organismos significativos desde el punto de vista ecológico. La tinción celular ayuda a obtener esos números y vamos a detenernos en algunos de ellos. En medios naturales, los organismos también pueden detectarse por ensayo de sus *genes*. Los genes que codifican o bien RNA ribosómico (*véanse* Secciones 11.4 y 11.8) o bien un proceso metabólico específico son los objetivos típicos de estos estudios que vamos a tratar, junto con los métodos de «prospección de genes».

18.3 Viabilidad y cuantificación mediante técnicas de tinción

La microbiología ha ido desarrollando a lo largo de los años métodos de tinción muy diversos; algunos de ellos son apropiados para la cuantificación de microorganismos de muestras naturales. Aunque estos métodos dicen poco acerca de la composición fisiológica o filogenética de las poblaciones, se usan ampliamente y proporcionan información fiable cuantitativa sobre el *número total* de células en un hábitat particular.

Tinción fluorescente con DAPI

Las tinciones fluorescentes se han usado mucho para teñir microorganismos en hábitat opacos. El colorante **DAPI** (4',6-diamido-2-fenilindol) se utiliza con frecuencia para este propósito; las células teñidas con DAPI presentan fluorescencia azul brillante y son muy fáciles de ver y enumerar (*véase* Figura 18.6). La tinción DAPI se emplea para la enumeración de microorganismos en muestras clínicas, del ambiente y de alimentos.

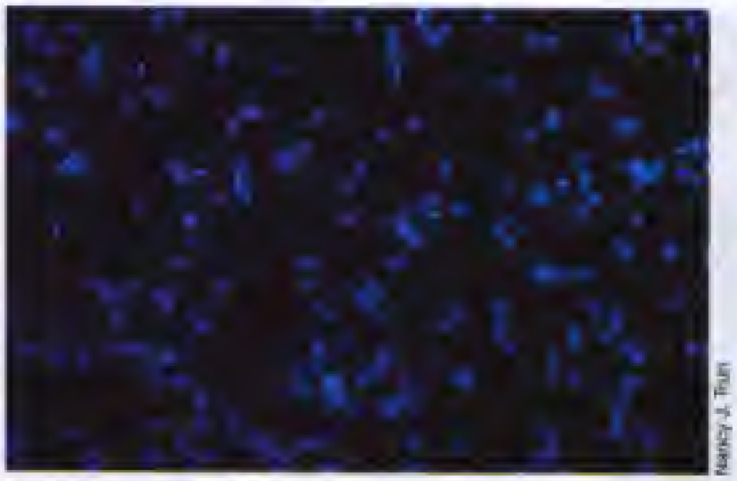


Figura 18.6 Células de *Escherichia coli* fluorescentes después de haber sido teñidas con DAPI. Esta técnica de tinción se emplea frecuentemente para recuentos microbianos totales.

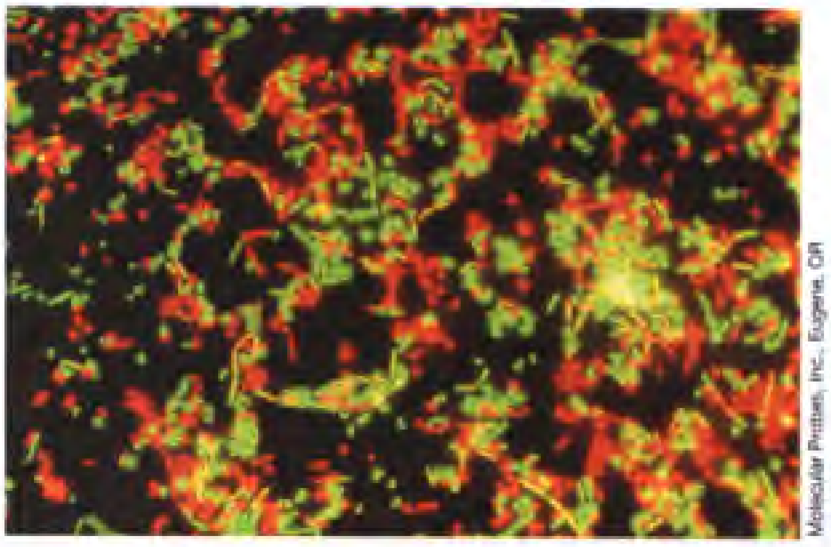
Dependiendo de la muestra, la tinción con colorantes fluorescentes no específicos puede representar un problema, pero el DAPI, que tiñe ácidos nucleicos, no suele reaccionar con la materia inerte. Por tanto, para muchas muestras de suelo y agua, la tinción con DAPI proporciona una estimación razonable del número de células presente. Para muestras acuáticas, las células se tiñen en la superficie de un filtro después de haber filtrado un volumen determinado de líquido. Estas técnicas sencillas tienen la ventaja de no ser específicas (tiñen *todos* los microorganismos de una muestra), pero con el inconveniente de que no diferencian entre células vivas y muertas, ni permiten el rastreo de organismos *específicos* en el ambiente.

Tinción de viables

Se ha desarrollado una tinción con colorantes fluorescentes que diferencia entre células vivas y muertas. Esto proporciona información no sólo del número de organismos de una muestra sino también de su viabilidad. Esta distinción se basa en la integridad de la membrana citoplasmática celular. A la muestra se añaden dos colorantes, verde y rojo; el colorante fluorescente verde penetra en todas las células, viables o no, mientras que el rojo, que contiene yoduro de propidio, penetra sólo en aquellas células cuya membrana ya no se encuentra intacta y, por tanto, están muertas. Las células verdes estaban vivas y las rojas muertas, lo que ofrece una evaluación instantánea de la viabilidad (*véase* Figura 18.7). Este método se utiliza con cultivos bacterianos de laboratorio, pero no es adecuado para el examen microscópico de hábitat naturales debido a problemas de tinción inespecífica de los materiales inertes.

Anticuerpos fluorescentes

Las técnicas de tinción con sustancias fluorescentes pueden hacerse más específicas con el empleo de *anticuerpos fluorescentes*. En la Sección 24.8, se tratará la base teórica de la tinción con anticuerpos fluorescentes. La gran especificidad de los anticuerpos frente a los constituyentes de la superficie de un organismo particular puede explotarse para identificar o rastrear un organismo en un hábitat complejo; por ejemplo, suelo o una muestra clínica que contenga una



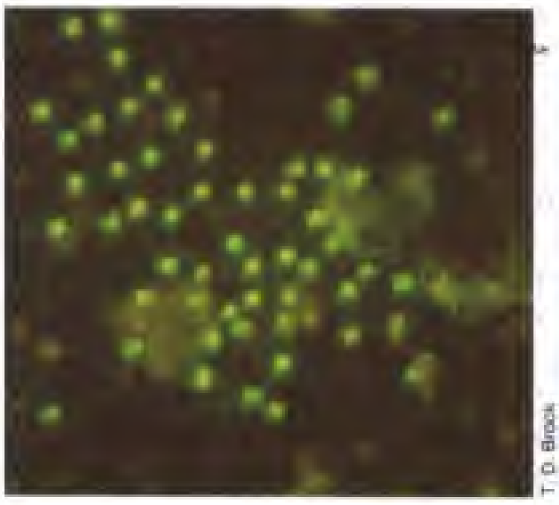
Molecular Probes, Inc., Eugene, OR

Figura 18.7 Tinción de células viables. Células vivas (verdes) y muertas (rojas) de *Micrococcus luteus* (cocos) y *Bacillus cereus* (bacilos) teñidas por el método de tinción LIVE/DEAD (vivas/muertas) Bac Light™ de viabilidad bacteriana.

mezcla de muchos organismos (*véase* Figura 18.8). El método requiere la preparación de anticuerpos específicos contra los organismos que interesan, lo cual es largo y laborioso. Sin embargo, para el caso de microorganismos de importancia clínica, se dispone comercialmente de anticuerpos de alta especificidad, por lo que son utilizados en los laboratorios microbiológicos clínicos (*véanse* Sección 24.8 y Figura 24.16).

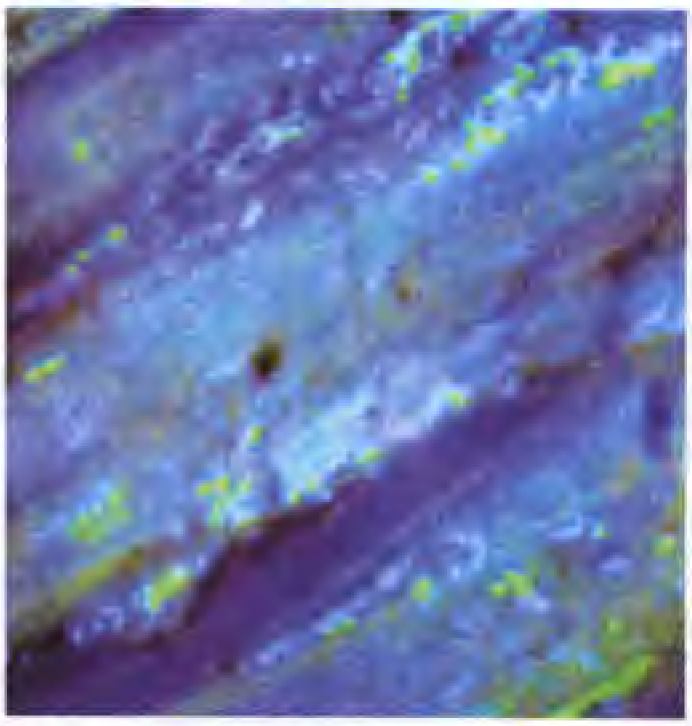
Proteína fluorescente verde para el etiquetado celular

Las células bacterianas pueden ser alteradas mediante técnicas de ingeniería genética para volverlas fluorescentes. Como se indica en el Capítulo 31, en el genoma de cualquier bacteria se puede insertar un gen que codifica una *proteína fluorescente verde* (GFP, *green fluorescent protein*). Al expresarse, las células que contienen la GFP aparecen de color verde cuando se observan con un microscopio de luz ultravioleta (*véase* Figura 18.9).



T. D. Brock

Figura 18.8 Etiquetado celular con anticuerpos fluorescentes. Mediante la técnica de anticuerpos fluorescentes se observan microcolonias bacterianas (las células aparecen como puntos verde-amarillentos) y la arquea hipertermófila *Sulfolobus acidocaldarius* en la superficie de partículas del suelo de una solfatara. Las células miden alrededor de 1 µm de diámetro.



Bo Normander

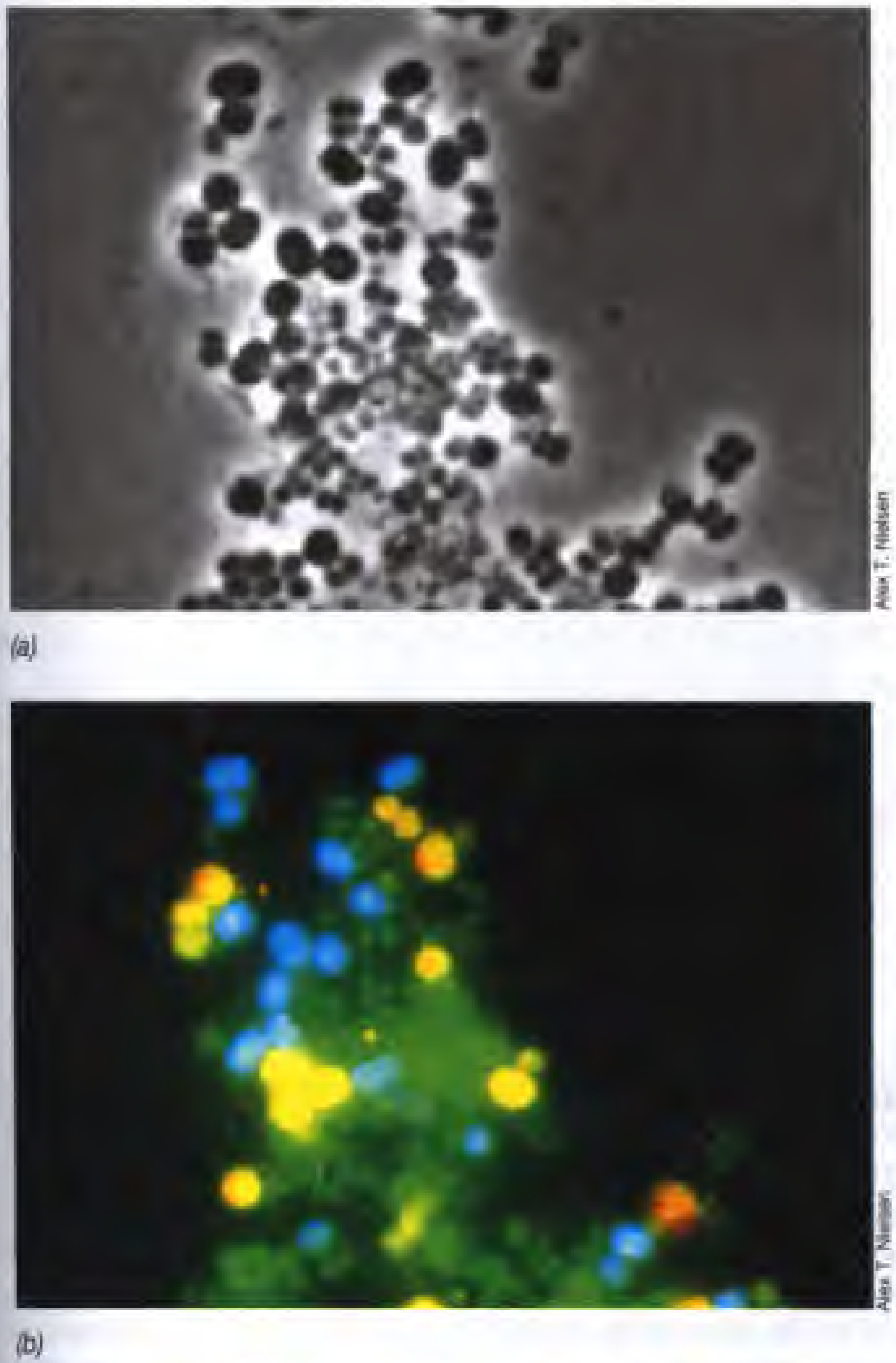
Figura 18.9 Células de *Pseudomonas fluorescens* modificadas por ingeniería genética que expresan la proteína verde fluorescente (GFP), observadas por microscopía láser confocal (*véase* Sección 4.2). Las células están adheridas a raíces de cebada y presentan fluorescencia de color verde. Las células teñidas de azul son parte de la biota normal de las raíces de cebada y se han teñido con el colorante inespecífico DAPI (véase Sección 18.3 y Figura 18.6). El uso de la GFP permite rastrear las células introducidas en el ambiente.

Aunque no resulta útil para el estudio de poblaciones naturales (porque estas células carecen del gen GFP), las células etiquetadas con GFP se pueden *introducir* en un medio, como las raíces de las plantas (Figura 18.9), y seguir con el microscopio la cepa etiquetada. Con este método, los ecólogos microbianos pueden estudiar *in situ* la competencia microbiana entre la microbiota nativa y la cepa con GFP introducida, o evaluar el efecto de la perturbación en el ambiente. La GFP también se ha usado ampliamente en cultivos de laboratorio como gen «indicador» (*reporter*). Cuando se fusiona con un operón bajo el control de un represor específico, el control transcripcional de los genes se puede estudiar por fluorescencia. Es decir, cuando se transcriben los genes que contienen el gen GFP fusionado, también lo hace el gen GFP. Tras la traducción de la proteína fluorescente verde, las células muestran una fluorescencia de color verde (*véase* Sección 31.4).

Limitaciones de la microscopía

Con todo lo expuesto, debería quedar claro que la microscopía es un valioso instrumento para la enumeración e identificación de microorganismos en muestras naturales. Pero cabe preguntarse si el microscopio es suficiente para el estudio de los microorganismos en sus hábitat naturales. La respuesta es «no», y lo es por varias razones. El principal problema pueden ser las células pequeñas. Cuando se observan muestras naturales, los procariotas muy pequeños pueden pasar inadvertidos, especialmente si la muestra contiene mucha materia orgánica o números elevados de células grandes. También suele ser difícil diferenciar entre células vivas y muertas y la materia inerte.

Sin embargo, el principal inconveniente del microscopio y de las tinciones es la imposibilidad de evaluar la diversidad *genética* de los microorganismos en un hábitat natural. A este respecto, es fácil ser engañado por la observación microscópica. Por ejemplo, dos células bastante similares morfológicamente pueden, de hecho, ser genéticamente muy distintas (*véase* Figura 18.10) y, por tanto, desempeñar funciones diferentes en el ecosistema. Efectivamente, cuando se usa el microscopio en estudios ecológicos, se debería recordar el viejo refrán de que «no es oro todo lo que reluce». Cuando se observa una población natural de microorganismos en el microscopio, tendríamos que ser conscientes que la muestra contiene una población de células genéticamente diversas, incluso aunque muchas de ellas «parezcan» que son la misma.



Alex T. Nielsen

Alex T. Nielsen

Figura 18.10 Morfología y diversidad genética. Las dos fotos del mismo campo de células, (a) microscopia de contraste de fase y (b) tinción filogenética (*véase* Sección 18.4). Aunque las células ovaladas grandes tienen una morfología y tamaño poco corrientes en procariotas, y parecen similares por microscopía de contraste de fases, la tinción filogenética revela que son dos tipos distintos genéticamente. La simple observación por microscopia óptica de muestras naturales tiene en consecuencia que interpretarse con cautela, ya que es fácil suponer que todas las células de morfología poco frecuente de un solo campo microscópico son el mismo organismo. Las células ovales teñidas de azul o amarillo tienen alrededor de 2,25 µm de diámetro.

Así, aunque el microscopio sea importante para el ecólogo microbiano, tiene que complementarse con métodos de cultivo o moleculares, preferiblemente ambos, si se quiere entender bien la ecología de un ecosistema microbiano. Los métodos moleculares se basan en genes diana (*target*) específicos ligados con un microorganismo en particular; la detección de estos genes permite inferir la presencia del organismo. A continuación, se tratan estos métodos moleculares, en algunos de los cuales también interviene la microscopía (*véase* Figura 18.10).

✓ 18.3 Revisión de conceptos

El DAPI es un colorante genérico para la identificación de microorganismos en muestras naturales. Algunos colorantes diferencian entre células vivas y muertas. También se pueden preparar anticuerpos fluorescentes específicos para una célula o para un pequeño grupo de células relacionadas. La proteína fluorescente verde convierte las células en autofluorescentes y puede ser muy útil para rastrear células introducidas en el ambiente. A diferencia de los cultivos axénicos, en muestras naturales las células que son similares morfológicamente pueden ser completamente diferentes.

- ✓ ¿Por qué es incorrecto decir que la GFP es un método de «tinción»?
- ✓ Sobre la base de la especificidad, ¿en qué se diferencian los colorantes como el DAPI de los anticuerpos fluorescentes?

18.4 Tinciones genéticas

Las sondas de ácidos nucleicos son un poderoso instrumento para identificar y cuantificar microorganismos en la naturaleza. Recuérdese que una **sonda de ácido nucleico** es un oligonucleótido de DNA o RNA complementario a una secuencia en un gen diana (*véase* Sección 10.12). Como se ha discutido en la Sección 11.6, algunas sondas de oligonucleótidos pueden hacerse fluorescentes mediante colorantes; estas sondas fluorescentes pueden utilizarse para identificar organismos que contienen una secuencia de ácido nucleico complementaria. La técnica se conoce como **hibridación fluorescente *in situ*** (**FISH,** *fluorescent in situ hybridization*, *véase* Sección 11.6), de la que describimos a continuación tres aplicaciones.

Tinción filogenética con FISH

Los *colorantes filogenéticos* son oligonucleótidos fluorescentes complementarios en la secuencia de base a las secuencias «signatura» en el rRNA 16S (en procariotas) o 18S (en eucariotas) (*véase* Sección 11.6). Los colorantes filogenéticos penetran en la célula, donde hibridan con el RNA ribosómico directamente en los ribosomas (Figura 18.11). Como se han identificado sondas filogenéticas signatura para especies microbianas individuales, así como para dominios enteros de organismos, el grado de especificidad de un colorante filogenético puede controlarse mediante la se-

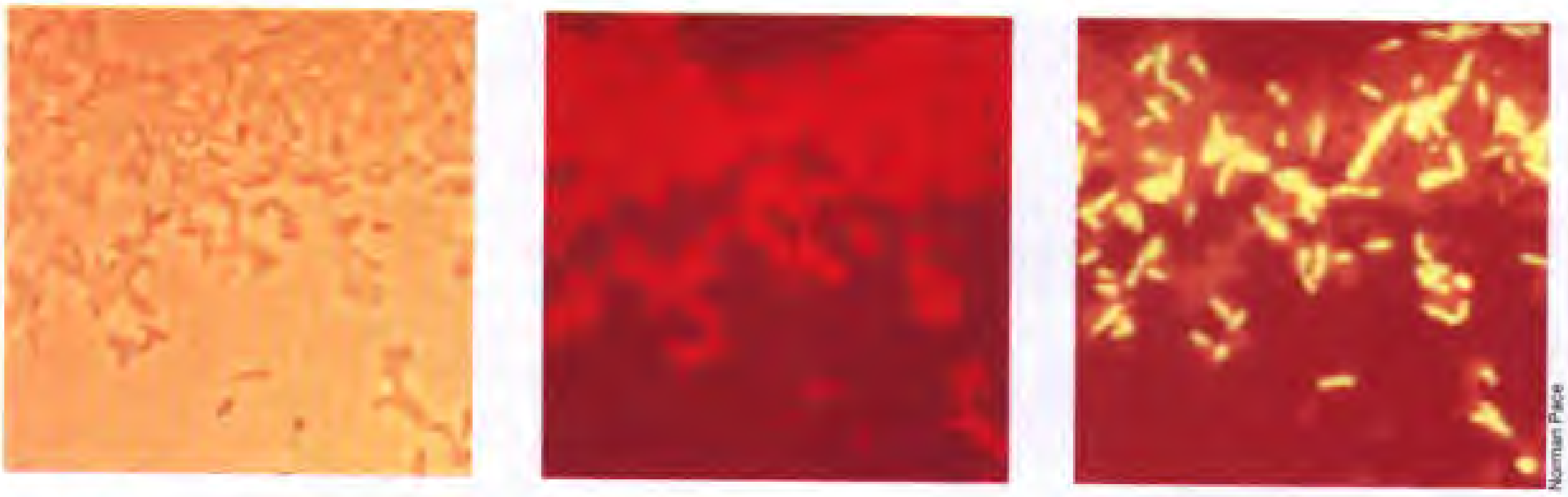


Figura 18.11 Métodos de sondas de ácidos nucleicos para la identificación de microorganismos. Diferenciación de microorganismos Gram negativos del dominio *Bacteria* estrechamente relacionados. Izquierda, micrografía de contraste de fases de una mezcla de *Proteus vulgaris* y una bacteria relacionada aislada de un insecto. Centro, el mismo campo teñido con una sonda de rRNA 16S específica para todos los miembros del dominio *Bacteria*. Derecha, el mismo campo teñido con una sonda específica para la bacteria aislada de un insecto. En ambos casos, las células miden alrededor de 0,6 μm de diámetro.

cuencia de la sonda fusionada al colorante. La FISH permite identificar o rastrear un organismo particular (o un grupo de organismos relacionados, dependiendo de la especificidad de la sonda).

Las muestras naturales pueden estudiarse también mediante sondas filogenéticas *múltiples* por FISH. Con una serie de sondas, cada una de las cuales está diseñada para reaccionar con un organismo o grupo particular y contiene su propio colorante fluorescente, la técnica FISH puede caracterizar filogenéticamente un hábitat completo (*véase* Figura 18.12). Si se combina la técnica FISH con la microscopía confocal (*véase* Sección 3.2), es posible incluso, explorar poblaciones microbianas en una muestra que tenga *profundidad*, como por ejemplo un biofilm (*véanse* Sección 19.3 y Figuras 18.12 y 19.4). Las aplicaciones de la tecnología FISH parecen ser muy numerosas, por lo que se ha hecho muy popular en ecología microbiana como herramienta para identificar organismos patógenos específicos en la industria alimentaria y en el diagnóstico clínico.

Tinción de cromosomas y transcripción inversa *in situ*

Otras técnicas de FISH son la *tinción de cromosomas* y la *transcripción inversa in situ*. La primera se emplea para identificar genes específicos de la microbiota de muestras naturales, mientras que la segunda se dirige a un mRNA específico (es decir, a genes *expresados*).

La tinción de cromosomas se inicia con el marcado fluorescente de una sonda de oligonucleótidos o del gen com-

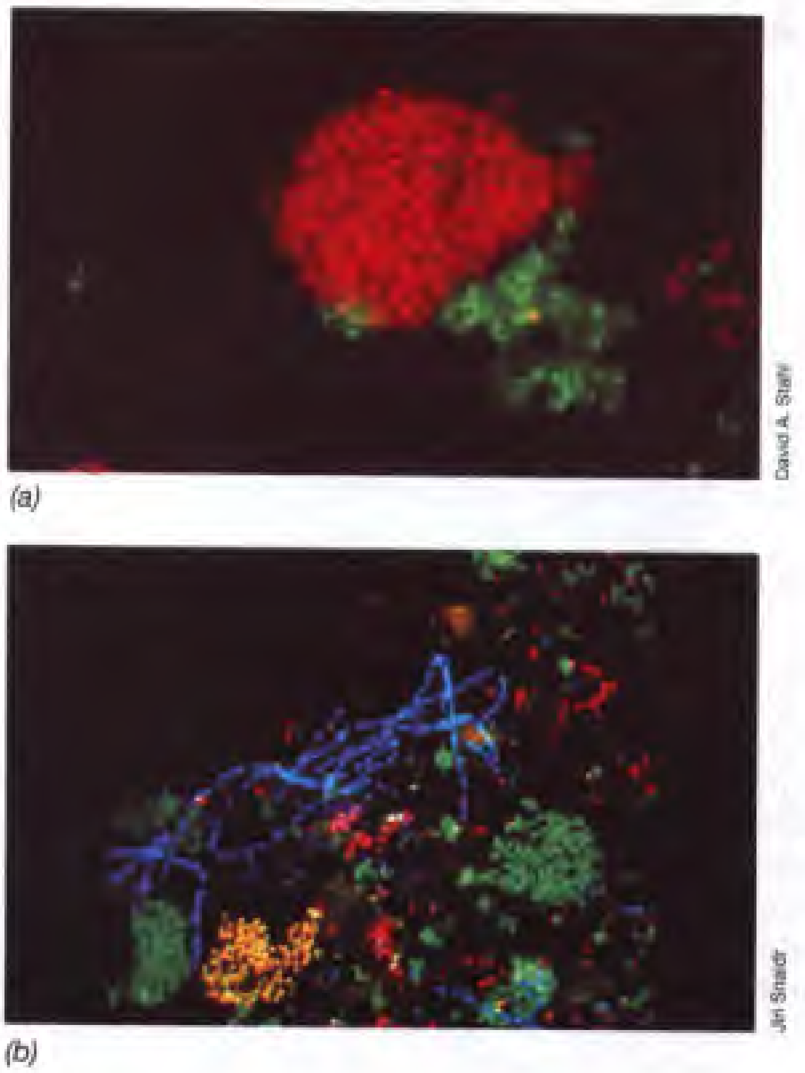


Figura 18.12 Utilización de sondas FISH múltiples en muestras de aguas residuales para evaluar la diversidad microbiana. (a) Bacterias nitrificantes de aguas residuales. En rojo, bacterias oxidadoras de amoniaco ($NH_3 \rightarrow NO_2^-$) en verde, bacterias oxidadoras de nitritos ($NO_2^- \rightarrow NO_3^-$). Nótese que el hecho de que los dos tipos metabólicos estén tan juntos permite la alimentación cruzada de NO_2^-. (b) Micrografía láser confocal de rastreo de una muestra de fango de aguas residuales. La muestra fue tratada con tres sondas filogenéticas, cada una con un colorante fluorescente distinto (verde, rojo o púrpura), y cada una destinada a un grupo diferente de proteobacterias (uno de los principales linajes del dominio *Bacteria*, *véase* Capítulo 12). Las células teñidas de verde, rojo o púrpura reaccionan sólo con una sonda, mientras que las que están teñidas de azul o amarillo reaccionan con dos sondas para dar los diferentes colores. La diversidad genética de esta muestra resulta obvia por los muchos colores, pero hay que considerar que las sondas fueron diseñadas para reaccionar con un grupo relativamente restringido de proteobacterias. Ni las *Archaea* (*véase* Capítulo 13), ni otros grupos de *Bacteria* (*véase* Capítulo 12), se pondrían de manifiesto en estas condiciones. Por consiguiente, la diversidad genética real de la muestra es, sin duda, mucho mayor que la que aparece aquí.

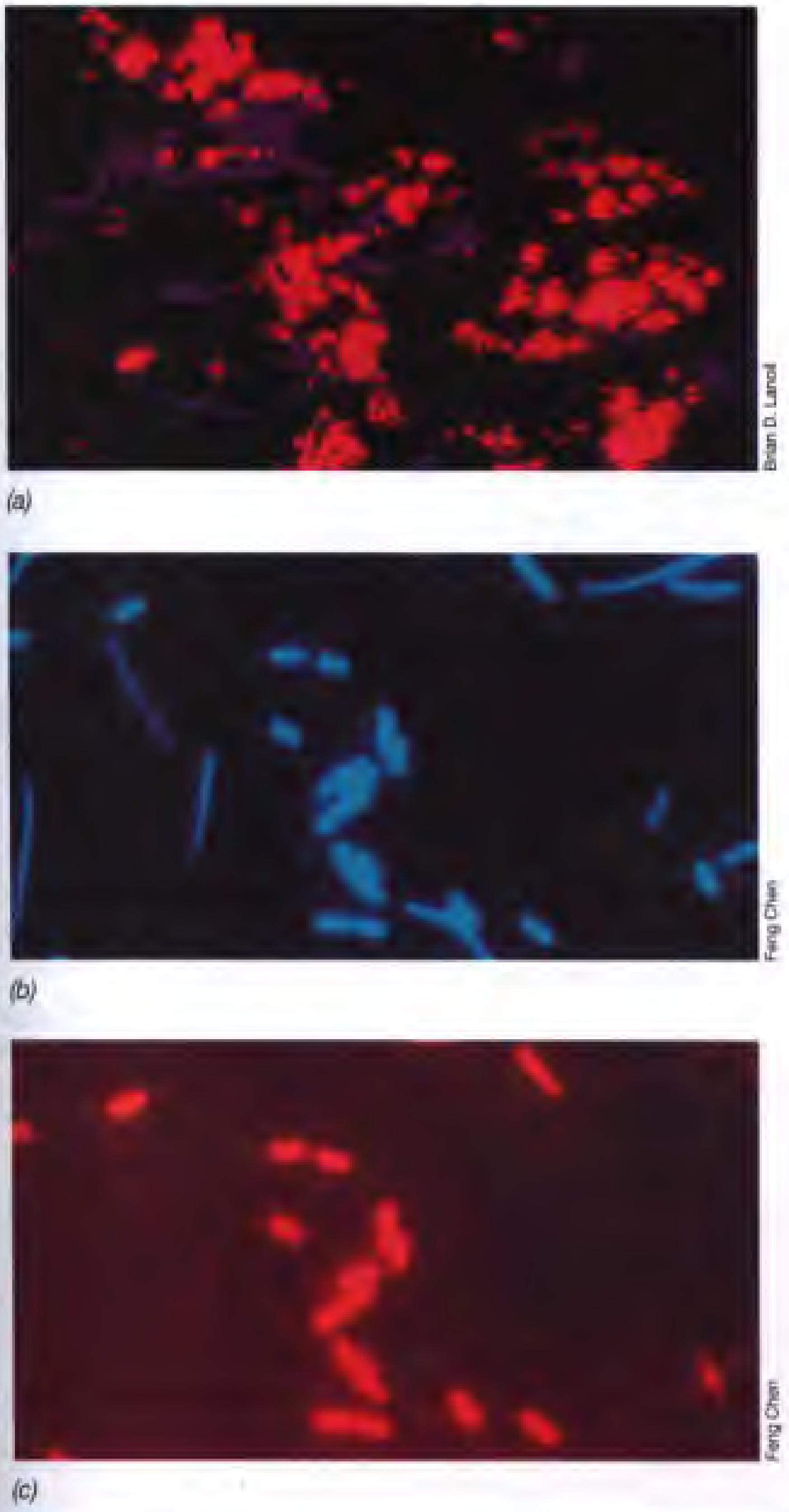


Figura 18.13 Técnicas de fluorescencia que emplean tinción de cromosomas bacterianos y transcripción inversa *in situ* (ISRT). (a) Tinción de cromosomas. Mezcla de células de *Escherichia coli* (rojo) y *Oceanospirillum linum* (azul). Cada colorante fluorescente se unió a oligonucleótidos de DNA formados a partir del DNA genómico de los respectivos organismos. Debido a las diferencias significativas de secuencia en el genoma de cada organismo, los genes marcados sólo se hibridan con el DNA genómico de sus organismos respectivos. (b, c) ISRT. Las dos fotos muestran un cultivo mixto de las bacterias *Microbulbifer hydrolyticus* (bacilos gruesos y cortos) y *Sagittula stellata* (bacilos delgados y largos). La transcripción inversa (*véase* Sección 9.12) de un mRNA específico producido sólo por *M. hydrolyticus* dio lugar a un cDNA que fue amplificado posteriormente por PCR e hibridado con una sonda marcada con fluorescencia. (b) Todas las células están teñidas con DAPI, una tinción inespecífica (*véase* Figura 18.6). (c) Células teñidas con una sonda ISRT. La información proporcionada por esta técnica es útil para conocer qué organismo(s) de una comunidad microbiana lleva(n) a cabo actividades metabólicas específicas.

pleto, de un conjunto de genes, o incluso de un genoma completo digerido para obtener sondas pequeñas. Las sondas se utilizan entonces para averiguar qué organismo(s) de una muestra contiene(n) el gen o los genes presentes en la sonda(s) (*véase* Figura 18.13*a*). Por ejemplo, la tinción de cromosomas es útil para identificar bacterias que contienen genes específicos, como los que codifican la nitrogenasa, responsable de la fijación de nitrógeno (*véase* Sección 17.28), los componentes del centro de reacción fotosintético (*véase* Sección 17.4), o vías autotróficas específicas (*véanse* Secciones 17.6 y 17.7). Los números de células fluorescentes en cada caso darían una estimación de las bacterias fijadoras de nitrógeno, fototrofas o autotrofas, respectivamente, en una muestra natural.

A diferencia de la técnica anterior, la transcripción inversa *in situ* (ISRT, *in situ reverse transcription*) busca si un organismo está *expresando* un gen o genes determinados en la naturaleza en un momento determinado (*véase* Figura 18.13*b* y *c*). El método utiliza una sonda que hibrida con un mRNA específico previamente transcrito por las células en una muestra. Una vez que la sonda reacciona, tiene lugar la transcripción inversa (*véase* Sección 9.12), produciendo un DNA complementario que es amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (*véase* Sección 10.17). Finalmente, el DNA amplificado reacciona con una sonda fluorescente (*véase* Figura 18.13*b* y *c*). La principal ventaja de la FISH con ISRT sobre la tinción de cromosomas es que permite al investigador explorar los factores que controlan la expresión génica en poblaciones naturales y observar cómo las alteraciones experimentales en una muestra afectan a la transcripción de genes específicos.

✓ 18.4 Revisión de conceptos

Diversos métodos de tinción fluorescente utilizan el poder de las sondas de ácidos nucleicos para incrementar la especificidad de la tinción. Entre ellos están la tinción filogenética, la tinción de cromosomas y la transcripción inversa con hibridación fluorescente *in situ* (FISH-ISRT).

- ✓ ¿Qué parte de la célula es la diana en las sondas fluorescentes en las técnicas filogenéticas FISH?
- ✓ La tinción de cromosomas y la técnica FISH-ISRT proporcionan diferente información sobre las células en la naturaleza. Explíquelas.

18.5 PCR: relacionando genes específicos con organismos específicos

Muchos estudios en ecología microbiana no necesitan aislar los organismos, ni siquiera identificarlos por microscopía con las tinciones descritas en las Secciones 18.3 y 18.4. A menudo, el objetivo de un estudio es evaluar la biodiversidad de un hábitat *sin* emplear técnicas de cultivo, ni observar células. Con este objetivo, se han aislado y caracterizado *genes* específicos como medida de la biodiversidad de la comunidad microbiana. Como los genes específicos están ligados frecuentemente a organismos específicos, la detección del *gen* implica la presencia del *organismo*. Las principales técnicas en este tipo de análisis de comunidades microbianas son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente (DGGE), la clonación molecular y la secuenciación y análisis del DNA.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis de la comunidad microbiana

El principio de la PCR se ha tratado en el Capítulo 10 (*véase* Sección 10.7). Debe recordarse que los pasos principales de la PCR son: (1) una sonda de ácido nucleico hibrida una secuencia complementaria en un gen diana, (2) la DNA polimerasa copia el gen diana y (3) se consiguen múltiples copias del gen diana mediante ciclos sucesivos de separación de las cadenas de DNA, unión de los cebadores y nueva síntesis (*véase* Figura 10.45). A partir de una sola copia de un gen, se pueden obtener varios millones de copias y el DNA amplificado puede observarse en un gel (*véase* Figura 18.14).

¿Qué genes pueden usarse como diana? Un gen que se amplifica frecuentemente es el que codifica el RNA ribosómico 16S. Recuérdese que el análisis de la secuencia de genes rRNA 16S se puede usar para establecer relaciones filogenéticas (*véanse* Sección 11.7 y Figura 11.13). De la misma forma, el análisis de la secuencia de genes de rRNA 16S amplificados a partir de una comunidad microbiana puede ofrecer una imagen filogenética de esa comunidad (*véase* Figura 18.14). De manera alternativa, también pueden ser dianas los genes metabólicos que codifican proteínas particulares del metabolismo de un organismo específico (o de un grupo de organismos relacionados). Con independencia del gen (o genes) escogido para la amplificación por PCR, es imprescindible que los cebadores tengan una elevada especificidad. Si la fuente de DNA es una muestra natural, el diseño de los cebadores es crítico para que los resultados no sean ambiguos y difícilmente interpretables.

En un ejemplo típico, el DNA total de la comunidad del hábitat que se quiere estudiar (Figura 18.14*a*). Se dispone de reactivos comerciales (*kits*) con el fin de obtener un DNA puro, sin restos de sustancias de la muestra que podrían interferir con la PCR (por ejemplo, suelo, metales y otros componentes físicos y químicos del hábitat). El DNA obtenido es una mezcla del DNA genómico de todos los microorganismos presentes originalmente en el hábitat (*véase* Figura 18.14*a*). La tarea de la PCR es «capturar» el gen o los genes diana que interesan en esta mezcla y hacer las copias suficientes para análisis posteriores.

En la Figura 18.14, se muestra la secuencia del análisis molecular de una comunidad microbiana a partir de una muestra ambiental. El resultado final son bandas del gen diana en un gel (*véanse* Figuras 18.14 y 18.15). El hecho ideal es la aparición de una *sola* banda de una muestra dada (el tamaño del fragmento DNA amplificado viene determinado por la distancia entre los cebadores, *véase* Figura 10.45). Si el objetivo fundamental es la secuenciación, los productos de la PCR, que por lo general son una mezcla de las variantes del gen diana presente en la muestra, tienen que poder diferenciarse. Un método clave en la separación de productos de la PCR es la *electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente*, que se trata a continuación.

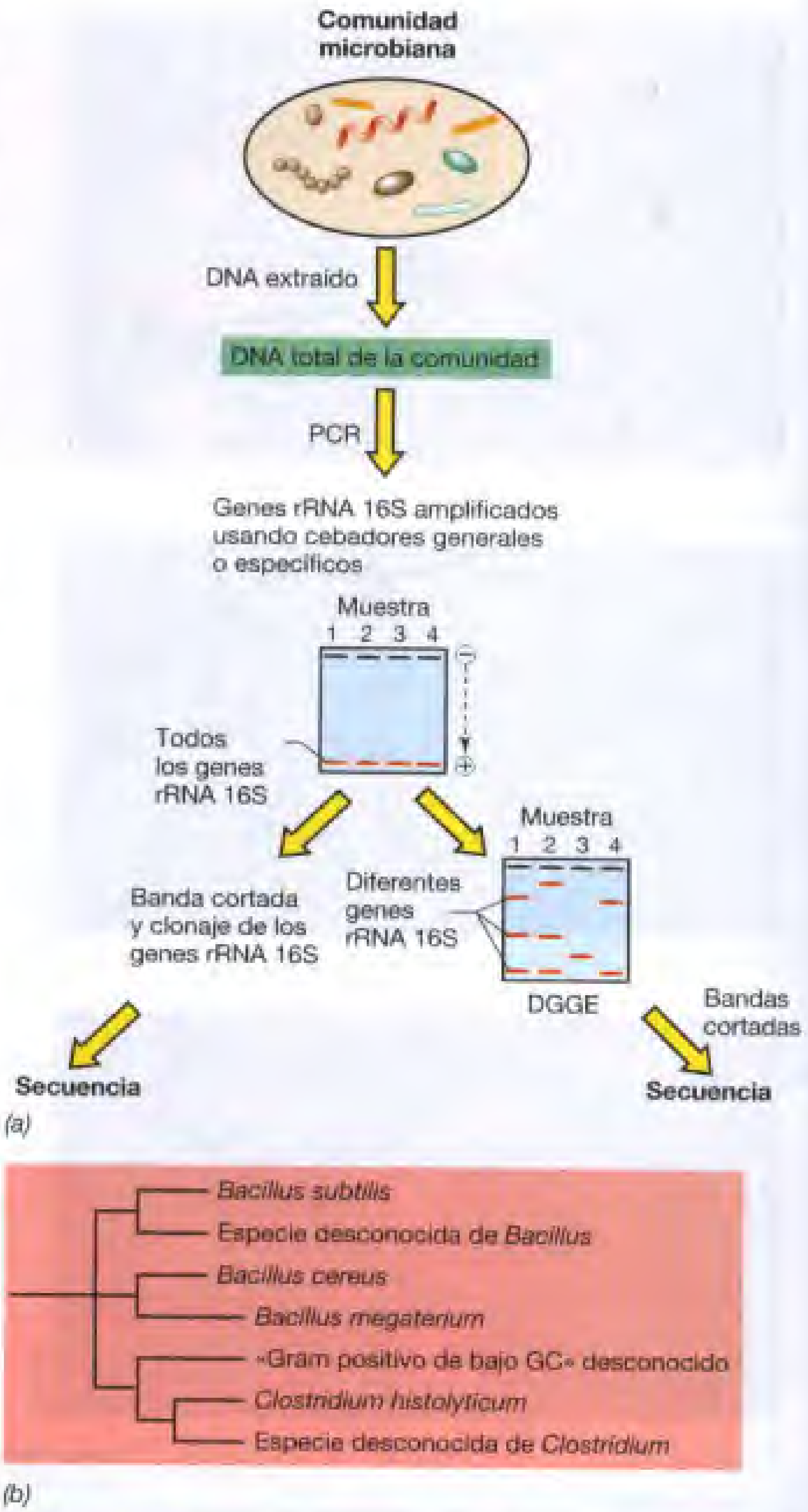
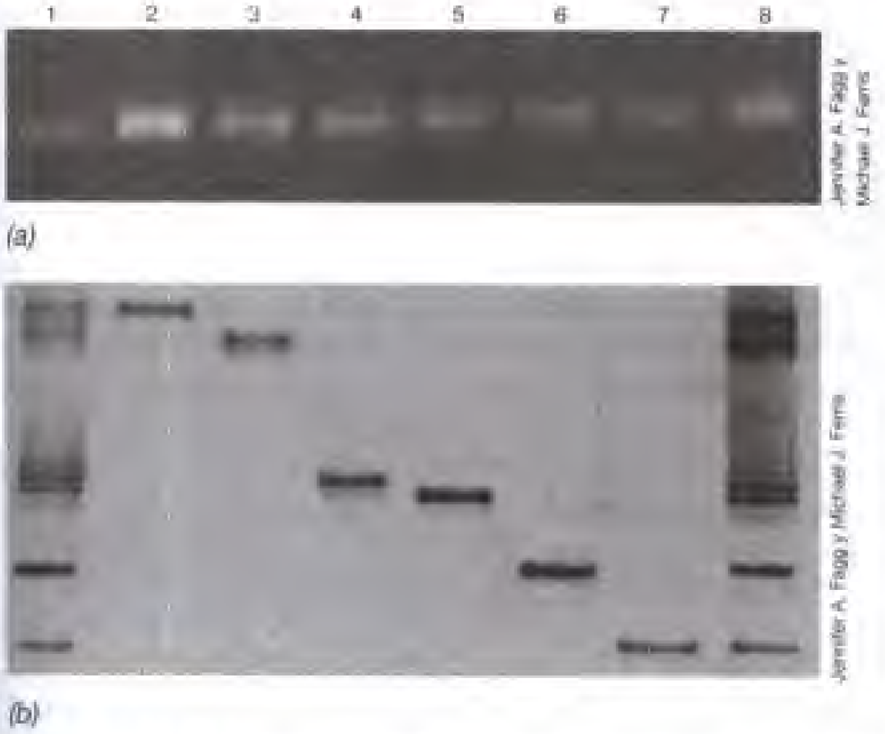

Comunidad microbiana
DNA extraído
DNA total de la comunidad
PCR
Genes rRNA 16S amplificados usando cebadores generales o específicos
Muestra
1 2 3 4
−
+
Todos los genes rRNA 16S
Muestra
1 2 3 4
Banda cortada y clonaje de los genes rRNA 16S
Diferentes genes rRNA 16S
DGGE
Bandas cortadas
Secuencia
Secuencia
(a)
Bacillus subtilis
Especie desconocida de *Bacillus*
Bacillus cereus
Bacillus megaterium
«Gram positivo de bajo GC» desconocido
Clostridium histolyticum
Especie desconocida de *Clostridium*
(b)

Figura 18.14 Pasos en el análisis de la biodiversidad de una comunidad microbiana mediante sondas filogenéticas. (a) Se utiliza el DNA total de la comunidad para amplificar los genes del rRNA 16S utilizando cebadores (*primers*) universales conservados para microorganismos del dominio *Bacteria*, o cebadores que se unirán sólo a un determinado filum del dominio *Bacteria*. Las bandas producidas por la PCR se cortan y los diferentes genes rRNA 16S se separan o por clonación o por DGGE (*véase* Figura 18.15). Nótese que en el gel de DGGE, las muestras 1, 2 y 4 comparten una banda (gen), mientras que las número 2 y 3 contienen una banda exclusiva. A partir de las secuencias obtenidas, se construye un árbol filogenético. (b) Ejemplo de árbol filogenético que podría obtenerse usando cebadores específicos para el linaje «Gram positivo de bajo GC» del dominio *Bacteria*, que incluye las especies de *Bacillus* y *Clostridium* (*véase* Sección 12.21). Nótese que muchas de las secuencias no muestran homología con la secuencia del rRNA 16S de ninguna especie conocida, por lo que, en consecuencia, son especies «nuevas» en espera de ser aisladas.



Jennifer A. Fagg y Michael J. Ferris

Jennifer A. Fagg y Michael J. Ferris

Figura 18.15 Análisis por PCR y DGGE coordinados. Se aisló el DNA total de una comunidad microbiana y se amplió por PCR usando cebadores para genes rRNA 16S del dominio *Bacteria* (a: bandas 1 y 8). Los productos de la PCR dan una única banda, pero realmente constan de seis secuencias distintas de genes rRNA 16S, como demuestra la DGGE (b: bandas 1 y 8). Cada una de estas seis bandas se purifica y reamplifica por PCR (a: bandas 2-7), y después se somete de nuevo a DGGE (b: bandas 2-7). Nótese que en el gel de la PCR (a) todas las bandas están en la misma posición, ya que aunque difieren en la secuencia tienen el mismo tamaño. Después cada banda podría secuenciarse y se generaría un árbol filogenético, como se muestra en la Figura 18.14.

Electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente (DGGE): separación de genes similares

La amplificación por PCR con un conjunto de cebadores da lugar generalmente a una única banda de gel que contiene fragmentos de DNA amplificado de un solo tamaño (*véase* Figura 18.14 y 18.15). A pesar de su aparente pureza, la banda puede contener un número elevado de genes muy relacionados, pero no idénticos. Esto sucede porque aunque los lugares donde se unen los cebadores del gen diana están muy conservados, la secuencia de nucleótidos *entre* esos lugares de unión puede variar como resultado de la divergencia evolutiva del gen diana en las diferentes especies. Para el análisis filogenético de las secuencias de los genes amplificados, se necesita un paso extra para distinguir las formas diferentes del gen antes de iniciar la secuenciación. Un método para hacerlo es mediante la clonación molecular (*véanse* Figura 18.14 y Sección 10.14). Otra posibilidad es la electroforesis en **gel desnaturalizante en gradiente (DGGE).**

La DGGE es un método de electroforesis en gel que separa los genes del mismo *tamaño* que difieren en la *secuencia de bases* (Figuras 18.14 y 18.15). La técnica utiliza un gradiente de una mezcla de urea y formamida que desnaturaliza el DNA. Un fragmento de DNA bicatenario se desplaza por el gel y cuando llega a una determinada concentración «desnaturalizante» las cadenas de DNA se separan y el desplazamiento se interrumpe (Figuras 18.14 y 18.15). Las diferencias en las propiedades de separación de las cadenas depende en gran parte de las diferencias en la secuencia de bases. Por tanto, las bandas observadas en un gel de DGGE con formas diferentes de un gen determinado que varían, a veces muy poco, en sus secuencias.

Las bandas individuales obtenidas por DGGE se pueden cortar y secuenciar (*véase* Figura 18.14). Con genes del rRNA 16S, por ejemplo, el análisis por DGGE proporciona una visión detallada del número de filotipos (genes rRNA 16S distintivos) presentes en el hábitat (*véase* Figura 18.15). Secuenciando estas bandas, es posible determinar las especies presentes en la comunidad por comparación de las secuencias de las especies conocidas disponibles a partir de bases de datos apropiadas (Figura 18.14*b*). Con otros genes (por ejemplo, genes metabólicos) se obtiene información acerca del número de tipos diferentes de organismos presentes en la comunidad que contiene el gen específico. Pero incluso sin secuenciar las bandas, el análisis por DGGE revela la biocomplejidad de un hábitat con respeto a un gen específico (Figuras 18.14 y 18.15), y también se puede emplear para otros análisis de la comunidad, como los enriquecimientos y la FISH (*véanse* Secciones 18.1 y 18.4).

Resultados del análisis filogenético de la PCR

El análisis filogenético por PCR de las comunidades microbianas ha dado resultados sorprendentes. Con el rRNA 16S como gen diana, se ha comprobado que la mayoría de comunidades microbianas contienen varios organismos filogenéticamente distintos, cuyas secuencias de RNA ribosómico no se emparejan con ninguno de los cultivos de laboratorio (*véanse* Figuras 18.14 y 18.15). De hecho, en muchos casos en los que se han refinado estos métodos para permitir tanto análisis cualitativos (para responder a la pregunta «¿quién hay ahí?»), como cuantitativos (saber «cuántos hay de cada tipo»), ¡resulta que los miembros más abundantes de las comunidades naturales son especies que hasta ahora no han podido ser cultivadas en el laboratorio! Este problema indica que nuestro conocimiento de la diversidad microbiana a partir de los cultivos de enriquecimiento es todavía muy incompleto y que el enriquecimiento presenta sesgos (*véase* Sección 18.10), lo cual supone un serio problema para los estudios de biodiversidad.

✓ 18.5 Revisión de conceptos

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplea para la amplificación de genes diana específicos, que son de utilidad en los análisis ecológicos, como los genes rRNA 16S o genes metabólicos clave. La electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente (DGEE) se emplea para resolver las pequeñas o grandes diferencias en las distintas versiones de los genes presentes en las diferentes especies de una muestra natural.

- ✓ ¿Por qué se dice que la especificidad del cebador es la clave del éxito de una PCR?
- ✓ ¿Qué puede concluirse del análisis por PCR/DGGE de una muestra que produce una banda mediante PCR y también una por DGGE? ¿Y si produce una banda por PCR y cuatro bandas por DGGE?
- ✓ ¿Qué hallazgo sorprendente ha surgido de muchos estudios moleculares de los hábitat naturales usando como gen diana el RNA ribosómico 16S?

III MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD MICROBIANA EN LA NATURALEZA

Empezamos este capítulo insistiendo en que los ecólogos microbianos se ocupan de la biodiversidad y de las actividades microbianas *in situ*. Hasta el momento, nuestra discusión se ha centrado en la biodiversidad. Volvemos ahora a la medición de la actividad microbiana, en particular mediante la utilización de (1) radioisótopos, (2) microelectrodos y (3) isótopos estables.

Queremos reiterar que cualquier medición de la actividad en una muestra natural es una estimación *colectiva* del conjunto de la comunidad microbiana. A pesar de estas limitaciones, si las mediciones están bien diseñadas, se pueden poner de manifiesto tanto los *tipos* como la *tasa* de las principales reacciones metabólicas en un hábitat. Junto con las estimaciones de biodiversidad, estos parámetros definen la ecología microbiana de ese hábitat y también proporcionan una información valiosa para el diseño de cultivos de enriquecimiento.

18.6 Radioisótopos y microelectrodos

En numerosas situaciones, la medida directa de las transformaciones químicas es suficiente para evaluar las que se producen en el ambiente. Por ejemplo, el destino de la oxidación de lactato por las bacterias sulfato reductoras en una muestra de sedimento es fácil de seguir; el lactato se consume y el SO_4^{2-} es reducido a H_2S (Figura 18.16*a*). Sin embargo, cuando se necesita una elevada sensibilidad, cuando es preciso determinar las tasas de recambio, o cuando hay que seguir el destino de parte de una molécula, los radioisótopos son muy útiles. Por ejemplo, en el caso de la fotoautotrofia, puede medirse la incorporación de $^{14}CO_2$ dependiente de la luz en las células microbianas (Figura 18.16*b*). Si lo que interesa es la reducción de sulfato, puede medirse la tasa de conversión de $^{35}SO_4^{2-}$ a $H_2^{35}S$ (*véase* Figura 18.16*c*). La actividad quimioorganotrófica se puede medir fácilmente evaluando la liberación de $^{14}CO_2$ de cualquier compuesto orgánico marcado con ^{14}C (Figura 18.16*d*)

Los métodos isotópicos son muy utilizados en ecología microbiana. Es preciso, sin embargo, recurrir a controles apropiados, ya que siempre existe la posibilidad de que alguna transformación de un compuesto marcado se deba a procesos estrictamente químicos (en vez de microbiológicos). El *control con células muertas* es esencial. Es absolutamente necesario demostrar que la transformación que se quiere medir es impedida por agentes químicos o por tratamiento con calor, que o bien bloquean la acción microbiana o bien matan los organismos. El formol a una concentración final del 4% se utiliza generalmente como esterilizante químico en los estudios de ecología microbiana. Esta concentración de formol mata todas las células y la transformación de los materiales marcados radiactivamente que tiene lugar debe atribuirse a procesos no biológicos (Figura 18.16*d*).

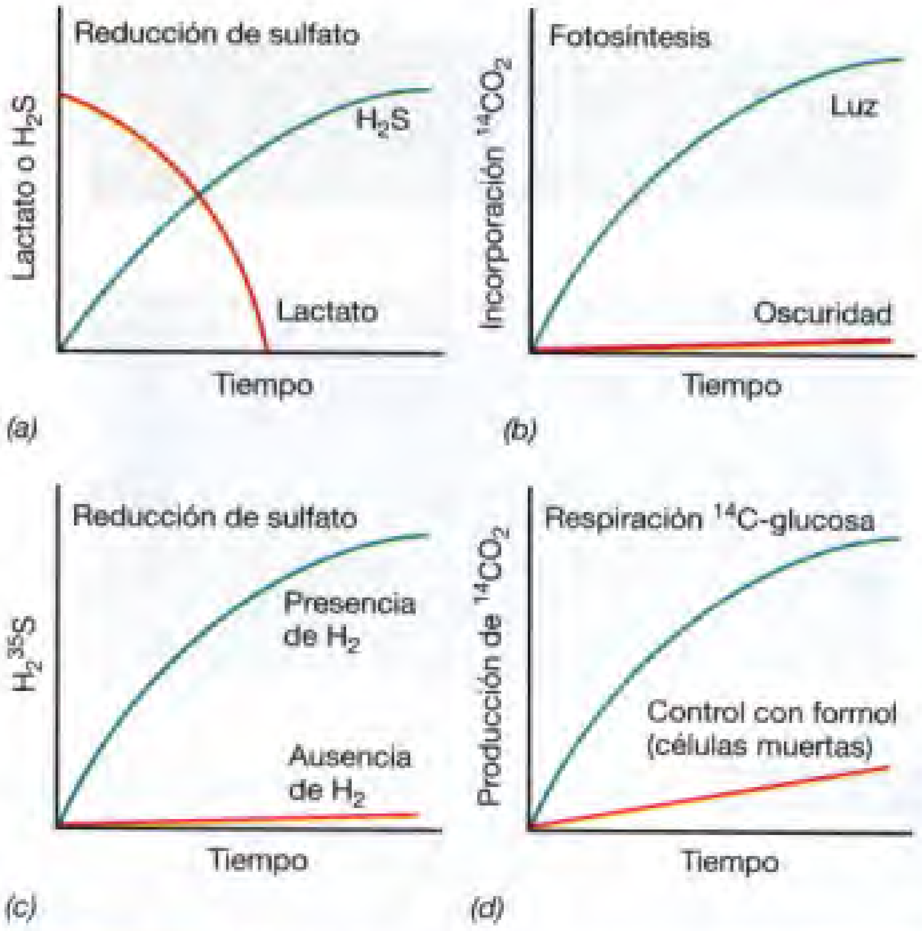


Figura 18.16 Medidas de la actividad microbiana. (a) Ensayo químico para lactato y H_2S durante la reducción de sulfato. (b-d) Uso de isótopos radiactivos. (b) Medida de la fotosíntesis en agua de mar con $^{14}CO_2$. (c) Reducción de sulfato en fango medida con $^{35}SO_4^{2-}$. (d) Producción de $^{14}CO_2$ a partir de glucosa marcada con ^{14}C.

Microelectrodos

Los ecólogos microbianos usan pequeños electrodos de cristal, denominados **microelectrodos,** para estudiar la actividad de los microorganismos en la naturaleza. Los más utilizados son los que miden pH, oxígeno, N_2O, CO_2, H_2 o H_2S. Como su nombre indica, son muy pequeños, y las puntas tienen un diámetro que oscila entre 2 y 100 μm (Fi-

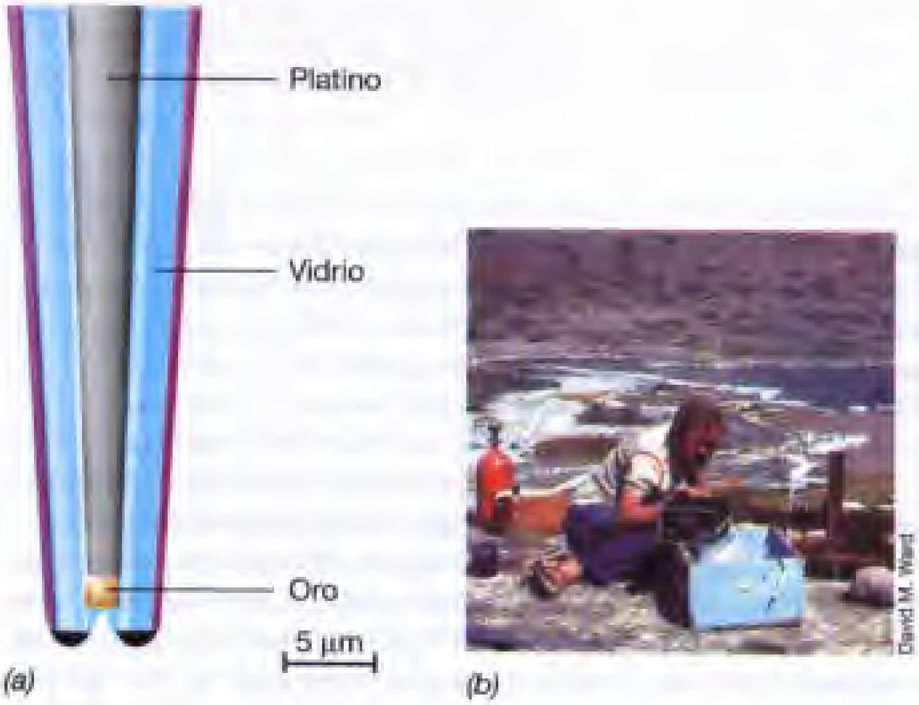
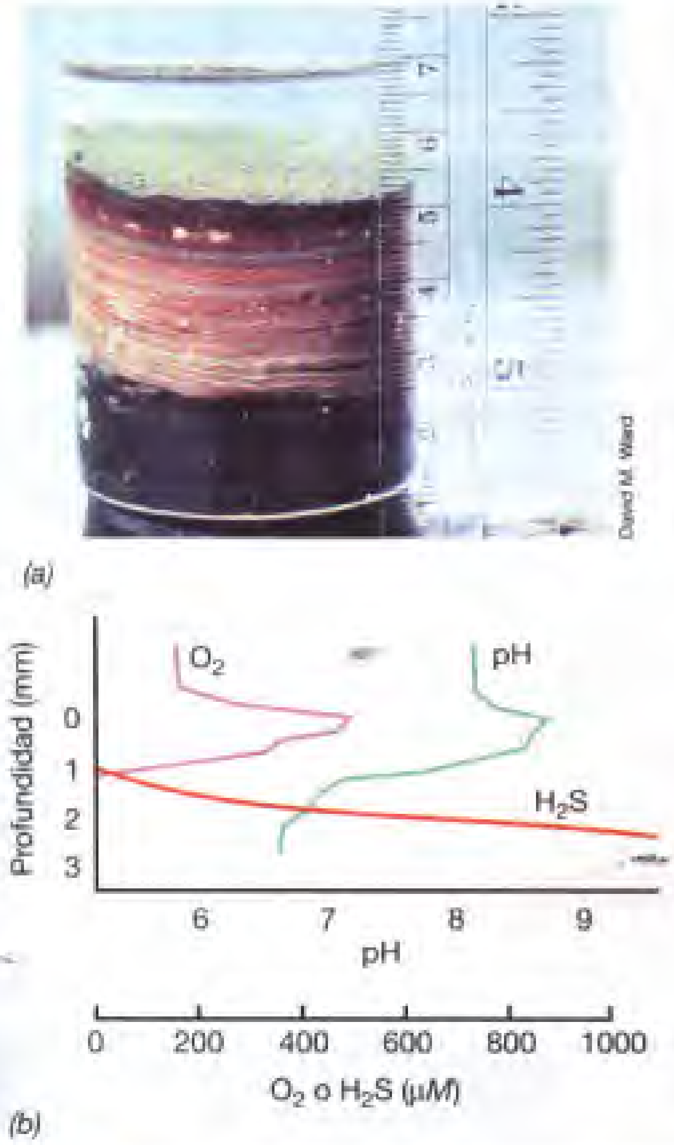


Figura 18.17 Microelectrodos. (a) Esquema de un microelectrodo de oxígeno. Obsérvese la escala del electrodo. (b) Foto de microelectrodos usados en un tapete microbiano (*véase* Figura 18.18*a*).

gura 18.17*a*). Los electrodos se tienen que insertar cuidadosamente en el hábitat utilizando un micromanipulador, dispositivo que permite un desplazamiento preciso en distancias de un milímetro o menos (Figura 18.17*b*).

Los microelectrodos se han utilizado ampliamente en el estudio de la fotosíntesis y de las transformaciones químicas que se llevan a cabo en los *tapetes microbianos*. Estos tapetes son comunidades microbianas estratificadas que normalmente contienen cianobacterias en la capa superior; bacterias fototróficas anoxigénicas, en las capas que están debajo (hasta donde llegue suficiente luz) y bacterias quimioorganotrofas, especialmente bacterias sulfato reductoras, en las capas inferiores (Figuras 18.17*b* y 18.18). Los tapetes microbianos se pueden encontrar en distintos tipos de ambientes, tales como en las zonas intermareales y junto a fuentes termales (Figura 18.18).

Los microelectrodos para O_2 permiten medir con gran precisión la concentración de oxígeno en los tapetes microbianos (Figura 18.18*b*) o en las partículas de suelo (*véase* Figura 19.2) a intervalos muy pequeños. Mediante un *micromanipulador*, se pueden introducir los electrodos en un hábitat microbiano y tomar lecturas cada 0,1 mm (100 μm) o menos (Figuras 18.17*b* y 18.18*b*). Con un banco de microelectrodos, cada uno de ellos sensible a una sustancia química diferente, se miden simultáneamente varias conversiones microbianas. La medida de la concentración de oxígeno y sulfuro suele tomarse conjuntamente, ya que en muchos ambientes microbianos se establecen gradientes de ambas especies químicas como resultado de la fotosíntesis y de la reducción de sulfato, respectivamente (Figura 18.18*b*). Próximo a la zona donde se inicia la mezcla de O_2 y H_2S, la intensa actividad de las bacterias del azufre fototróficas y quimiolitotróficas (*véase* Secciones 12.2 y 12.4) lleva el agotamiento de ambas moléculas, por debajo de la capacidad detectora de los microelectrodos (Figura 18.18*b*).



David M. Ward

Figura 18.18 Utilización de microelectrodos para el estudio de tapetes microbianos. (a) Fotografía de una porción del tapete microbiano de una fuente termal usado en el experimento que se muestra en (b). La parte superior (verde oscuro) contiene cianobacterias (*véase* Sección 12.25), por debajo de las cuales hay diversas capas de bacterias fototróficas anoxigénicas (colores anaranjado y amarillo), principalmente *Chloroflexus* (*véase* Sección 12.35). El espesor total del tapete es de aproximadamente 2 cm. (b) Microperfiles de oxígeno, sulfuro y pH del tapete microbiano de una fuente termal. Obsérvese la escala milimétrica de las ordenadas.

✓ 18.6 Revisión de conceptos

La actividad de los microorganismos en los ambientes naturales se evalúa con un alto grado de precisión con radioisótopos y/o con microelectrodos. En la mayoría de los casos, estas mediciones son de la actividad neta de una comunidad microbiana y no de la actividad de una población constituida por una sola especie.

- ✓ ¿Por qué son útiles los radioisótopos para medir la actividad de los microorganismos?
- ✓ ¿Cómo funciona un microelectrodo?

18.7 Isótopos estables

Muchos elementos químicos tienen diferentes isótopos, que difieren en el número de neutrones. Algunos son inestables y se degradan como resultado de la degradación radiactiva. Otros, denominados *isótopos estables*, no son radiactivos y se utilizan para el estudio de diversas transformaciones microbianas en la naturaleza.

Los dos elementos que han resultado de mayor utilidad para estudios con isótopos estables en ecología microbiana son el *carbono* y el *azufre*. En la naturaleza, el carbono se encuentra principalmente como ^{12}C, y en pequeña cantidad (alrededor del 5%) como ^{13}C. Lo mismo sucede con el azufre, cuya forma principal es ^{32}S, pero también se encuentra en menor cantidad como ^{34}S. La diferencia en la abundancia natural de estos isótopos varía cuando el carbono o el azufre son metabolizados por los organismos, porque (por razones relacionadas con la unión de los sustratos a la enzima) las reacciones bioquímicas tienden a favorecer al isótopo *más ligero*. Es decir que, cuando estos elementos intervienen en reacciones bioquímicas, sus isótopos más pesados son discriminados negativamente (Figura 18.19). Por tanto, cuando el CO_2 es atrapado por un organismo fototrofo, por ejemplo, el carbono celular se *enriquece* en ^{12}C y se *empobrece* en ^{13}C, con respecto al carbono de referencia. Del mismo modo, el sulfuro producido por la reducción bacteriana del sulfato es más «ligero» que el de origen geoquímico. Este fenómeno se conoce como **fraccionamiento isotópico** (Figura 18.19).

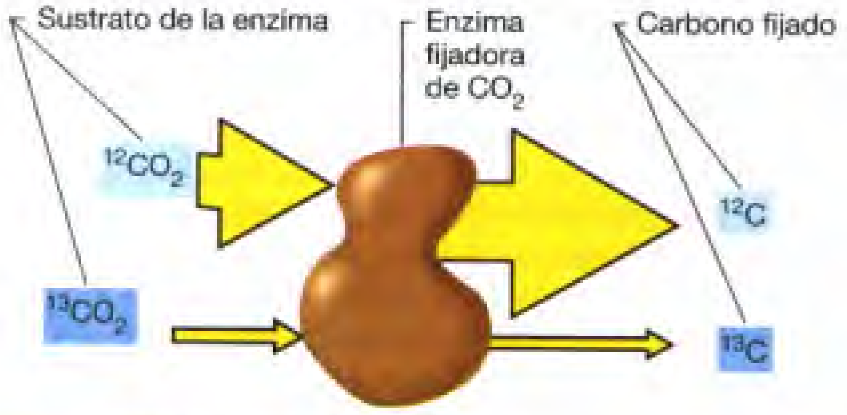


Figura 18.19 Mecanismo de fraccionamiento isotópico utilizando como ejemplo el carbono. Aunque la relación entre la abundancia natural de $^{12}CO_2$ y $^{13}CO_2$ está en torno a 19:1, las enzimas que fijan CO_2 lo hacen preferentemente con el isótopo más ligero (^{12}C). De esta forma, el carbono fijado aumenta la cantidad de ^{12}C y disminuye la de ^{13}C en relación con el sustrato inicial. El grado de disminución de ^{13}C se calcula como un fraccionamiento isotópico (*véase* el pie de la Figura 18.20 para el cálculo). El tamaño de las flechas indica la abundancia relativa de cada isótopo del carbono.

Fraccionamiento isotópico en ecología microbiana

La composición isotópica de una muestra contiene un registro de su actividad biológica pasada (Figuras 18.20 y 18.21). En el caso del carbono es fácil ver que la materia de origen vegetal y el petróleo (derivado de material biológico) poseen una composición isotópica similar; en ambos casos, el carbono es isotópicamente más ligero que su forma estándar no biológica porque su fijación siguió una vía metabólica que discriminaba la forma más pesada, $^{13}CO_2$ (Figura 18.20). El metano de origen microbiológico es extremadamente ligero, mientras que los carbonatos marinos son claramente de origen no biológico (Figura 18.19). Debido a las diferencias en la proporción de las formas ^{12}C y ^{13}C en el carbono de origen biológico y geológico, respectivamente, la relación isotópica $^{13}C/^{12}C$ de los estratos geológicos se utiliza para detectar la existencia de procesos biológicos en rocas antiguas. Es interesante observar que el carbono orgánico con una edad de 3500 millones de años muestre signos de fraccionamiento isotópico (Figura 18.20), lo cual apoya la creencia de la existencia de vida en aquel tiempo.

El fraccionamiento isotópico tiene diversas aplicaciones en ecología microbiana. A partir del fraccionamiento de $^{34}S/^{32}S$ es fácil reconocer en la naturaleza la actividad de las bacterias sulfato reductoras (Figura 18.21). Cuando se compara con un estándar de sulfuro, el sulfuro sedimentario se encuentra muy enriquecido en ^{32}S, mientras que el no biogénico (por ejemplo, el de las rocas ígneas de depósitos volcánicos) es considerablemente más pesado (Figura 18.21). El análisis de isótopos de azufre se ha usado también como prueba de la falta de vida o de procesos biológicos en la Luna. Por ejemplo, los datos de la Figura 18.21 muestran que la composición isotópica del sulfuro en las rocas lunares se aproxima a la del estándar (meteorito) y no a la de origen biológico. El conocimiento de los fraccionamientos en la reducción de sulfato y en la subsiguiente oxidación de sulfuro por bacterias quimiolitotrofas o fototrofas permite el seguimiento de algunos pasos importantes del ciclo del

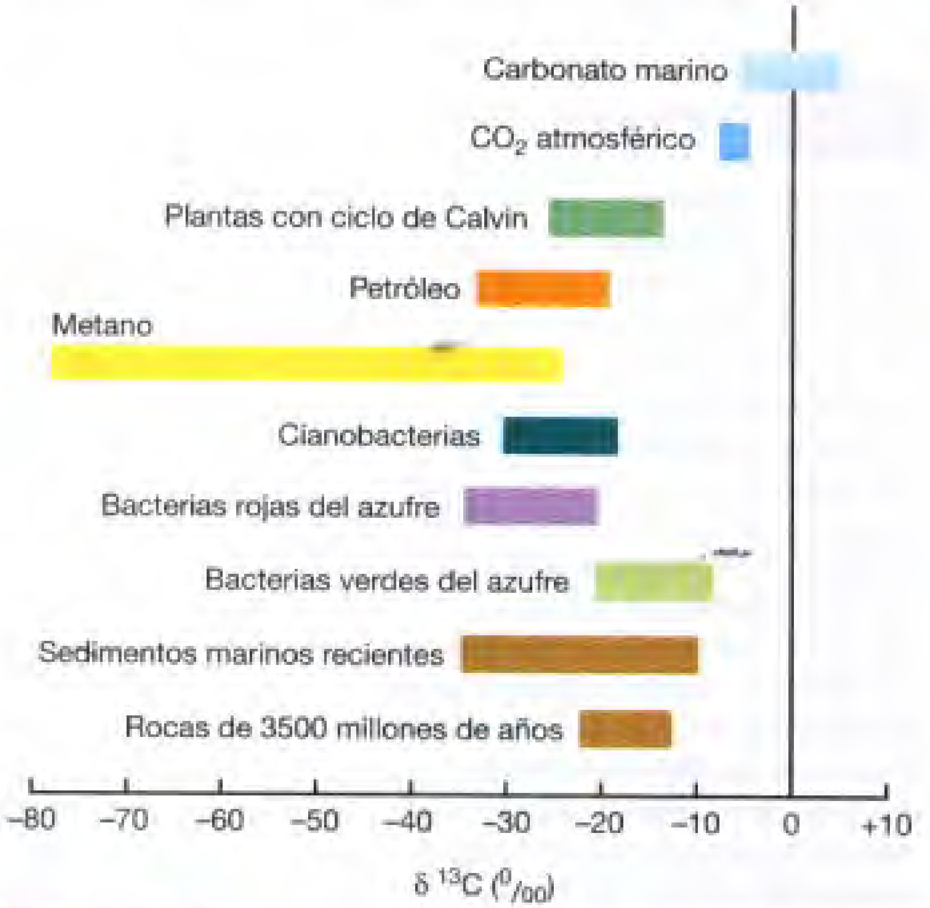


Figura 18.20 Composición isotópica de carbono de varias sustancias. Los valores se dan en partes por mil (‰) y se calculan mediante la fórmula

$$\frac{(^{13}C/^{12}C\text{ muestra}) - (^{13}C/^{12}C\text{ estándar})}{(^{13}C/^{12}C\text{ estándar})} \times 1000$$

La muestra estándar del C es el belemnite de la formación rocosa PeeDee (PDB). Nótese que el carbono fijado por los organismos autotróficos está enriquecido en ^{12}C.

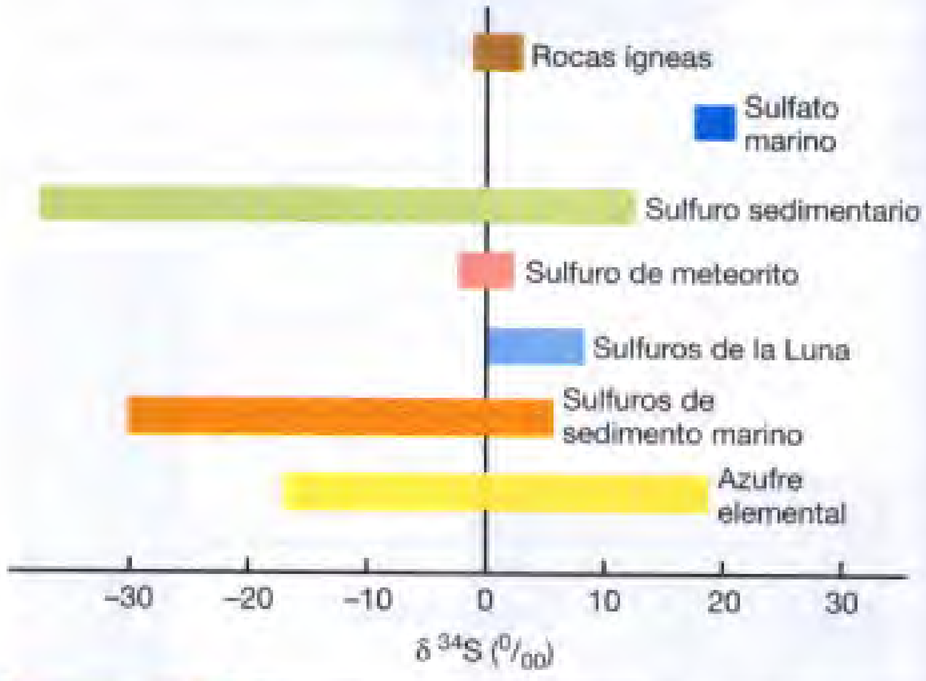


Figura 18.21 Resumen de la geoquímica isotópica del azufre, con indicación del margen de valores para ^{34}S y ^{32}S en varias sustancias que contienen azufre. Los valores se dan en partes por mil (‰) y se calculan mediante la fórmula

$$\frac{(^{13}S/^{12}S\text{ muestra}) - (^{13}S/^{12}S\text{ estándar})}{(^{13}S/^{12}S\text{ estándar})} \times 1000$$

La muestra estándar del S es un mineral de sulfuro de hierro procedente del meteorito de Canyon Diablo. Obsérvese que el sulfuro y el azufre de origen biogénico tienden a tener menos ^{34}S (están enriquecidos en ^{32}S).

azufre. Como se ha indicado, el análisis isotópico del carbono permite distinguir la materia orgánica biogénica de la abiogénica, y el análisis del oxígeno (mediante la medida del $^{18}O/^{16}O$) de rocas de diversas edades se usa para determinar la transición de la Tierra de un ambiente anóxico a otro óxico (el oxígeno molecular de la Tierra proviene de la fotosíntesis oxigénica efectuada por las cianobacterias, *véase* Sección 11.1).

Puesto que ya entendemos algunas de las técnicas de la caja de herramientas de los ecólogos microbianos, nos adentraremos a continuación en el Capítulo 19, que trata de la ecología microbiana. En él vamos a considerar la naturaleza de las comunidades microbianas y de las principales actividades de los microorganismos en la naturaleza. En muchas ocasiones, usaremos los métodos descritos en este capítulo para explorar estas relaciones y poner de manifiesto la contribución de los componentes microbianos al cuadro general del ecosistema.

✓ 18.7 Revisión de conceptos

El fraccionamiento isotópico aporta información sobre el origen biológico de diversas sustancias. El fraccionamiento es el resultado de la actividad de algunas enzimas que discriminan la forma más pesada de un elemento cuando se unen a sus sustratos.

- ✓ ¿Cómo puede la composición $^{12}C/^{13}C$ de una sustancia revelar su posible origen biológico?
- ✓ ¿Cuál sería la explicación más sencilla de que los sulfuros lunares sean isotópicamente pesados?

Preguntas de repaso

1. ¿Cuál es la base de la *técnica de cultivo de enriquecimiento*? ¿Por qué este método sólo es adecuado para el enriquecimiento de algún grupo o grupos de bacterias?
2. ¿Cuál es el principio de la columna de Winogradsky y qué tipo de organismos permite enriquecer? ¿Cómo podría usarse para enriquecer organismos de un ambiente extremo, como el tapete microbiano de una fuente termal?
3. Descríbase el principio del número más probable en la enumeración de bacterias de una muestra natural.
4. ¿Por qué habría que considerar el método de pinzas láser más efectivo que la dilución y el enriquecimiento líquido para obtener un organismo que está presente en números *bajos* en una muestra?
5. Compárese el uso de colorantes y anticuerpos fluorescentes en la enumeración de bacterias en medios naturales. ¿Cuáles son las ventajas y limitaciones de cada uno?
6. Para estudios de ecología microbiana, ¿pueden las sondas de ácidos nucleicos resultar tan sensibles como los métodos de cultivo? ¿Qué ventajas presentan los métodos de ácidos nucleicos sobre los métodos de cultivo? ¿Qué desventajas?
7. ¿Cómo funciona la *tinción de cromosomas*? ¿Por qué podría ser un buen método en la enumeración de microorganismos en un hábitat donde se llevaran a cabo procesos metabólicos específicos?
8. ¿Qué es la *proteína fluorescente verde*? ¿De qué forma una célula fluorescente verde se diferencia de una célula fluorescente procedente, por ejemplo, de la tinción con una cepa filogenética.
9. ¿Cómo se puede obtener el retrato filogenético de una comunidad microbiana sin haber hecho un cultivo de los habitantes?
10. Después de la amplificación por PCR del DNA de una comunidad usando un cebador específico, ¿por qué suele ser necesario clonar o someter a DGGE los productos antes de secuenciarlos?
11. ¿Cuáles son las principales ventajas de los *métodos radioisotópicos* en los estudios de ecología microbiana? ¿Qué tipo de controles (discútanse al menos dos) se deberían incluir en un experimento radioisotópico para mostrar la incorporación de $^{14}CO_2$ por las bacterias fototrofas, o la reducción de $^{35}SO_4^{2-}$ por bacterias sulfato reductoras?
12. Apórtense dos razones que expliquen por qué un estudio con microelectrodo de un tapete microbiano es mejor que un perfil de microelectrodo a través de una profundidad similar en una columna de agua.
13. Los organismos autotrofos, ¿contienen *más o menos* ^{12}C que el CO_2 con el que se alimentan?

Ejercicios prácticos

1. En relación con el enriquecimiento de las bacterias nitrificantes de la Tabla 18.1 ¿por qué son necesarios cada uno de los recursos y condiciones descritos? (Para responder a esta pregunta puede consultarse la Sección 17.14.)
2. ¿En qué se diferencian los colorantes como el DAPI de los colorantes filogenéticos a efectos de la evaluación de la diversidad microbiana de un hábitat?
3. Diséñese un experimento para medir la actividad de las bacterias oxidadoras del azufre en el suelo. ¿Cómo se podría demostrar que el resultado es debido a la actividad biológica?
4. Se quiere identificar en muestras de suelo organismos capaces de crecer autotróficamente mediante el ciclo de Calvin (*véase* Sección 17.6). Esta vía requiere una enzima especial, la ribulosa bifosfato carboxilasa (RubisCO). Indíquense dos formas de llevar a cabo la identificación, una usando un método microscópico y otra que no requiera ni un método de cultivo ni uno microscópico.

En la naturaleza, los microorganismos interaccionan entre sí y también con los animales y las plantas. Podemos destacar la ventajosa asociación que se establece entre las leguminosas y las bacterias del género *Rhizobium* y otras relacionadas. La bacteria penetra en la planta a través de las raíces y estimula la producción de unas estructuras parecidas a tumores que se conocen como *nódulos radicales*, como las que se ven en la fotografía de las raíces de una planta de soja. En el nódulo, las bacterias convierten el nitrógeno gaseoso en amoníaco, un proceso denominado *fijación de nitrógeno*. La mayor parte de este nitrógeno acaba en proteína vegetal, lo que permite el crecimiento de la planta en suelos deficientes en nitrógeno fijado. Además de asociaciones de este tipo, los microorganismos desempeñan una función crítica en la naturaleza como productores primarios, en la degradación y reciclado de elementos clave necesarios para los organismos superiores.

19

HÁBITAT MICROBIANOS, CICLOS DE NUTRIENTES E INTERACCIONES CON PLANTAS Y ANIMALES

I ECOSISTEMAS MICROBIANOS 625
19.1 Poblaciones, gremios y comunidades 626
19.2 Ambientes y microambientes 626
19.3 Crecimiento microbiano en superficies y biofilmes 628
II HÁBITAT MICROBIANOS TERRESTRES Y DE AGUA DULCE 630
19.4 Ambientes terrestres 630
19.5 Ambientes de agua dulce 634
III MICROBIOLOGÍA MARINA 635
19.6 Ambientes marinos y distribución de microorganismos 636
19.7 Microbiología de las profundidades marinas 638
19.8 Fuentes hidrotermales submarinas 639
IV CICLO DEL CARBONO Y DEL OXÍGENO 644
19.9 Ciclo del carbono 644
19.10 Sintrofia y metanogénesis 646
19.11 Ciclo del carbono en animales rumiantes 650
V OTROS CICLOS CLAVE DE NUTRIENTES 654
19.12 Ciclo del nitrógeno 654
19.13 Ciclo del azufre 656
19.14 Ciclo del hierro 658
VI BIORREMEDIO MICROBIANA 661
19.15 Lixiviado microbiano de menas minerales 661
19.16 Transformación del mercurio y de otros metales pesados 664
19.17 Biodegradación del petróleo 666
19.18 Biodegradación de compuestos xenobióticos 668

VII INTERACCIONES MICROBIANAS CON PLANTAS 671
19.19 El ambiente vegetal 671
19.20 Líquenes y micorrizas 672
19.21 Tumoración por *Agrobacterium* 675
19.22 Bacterias de los nódulos radicales y simbiosis con leguminosas 677

Glosario

Anóxico medio libre de oxígeno, por lo general extremadamente reducido (baja E_0')

Bacteroide células deformes de *Rhizobium* en el interior de un nódulo radical de leguminosa; puede fijar N_2

Barófilo organismo que crece mejor a presiones elevadas superiores a 1 atm

Barotolerante organismo que puede crecer a presiones elevadas, pero que crece mejor a presión atmosférica

Biofilme colonias de células microbianas recubiertas o incluidas en sustancias mucosas y adheridas a una superficie

Biogeoquímica estudio de las transformaciones químicas realizadas por organismos en el ambiente

Chimenea negra fuente hidrotermal submarina extremadamente caliente (250-350°C), que expulsa agua a elevada temperatura y minerales diversos

Cometabolismo metabolismo de un compuesto en presencia de un segundo compuesto orgánico, que es usado como fuente primaria de energía

Decloración reductora eliminación de Cl como Cl^- de un compuesto orgánico, reduciendo el átomo de carbono de C—Cl a C—H

Demanda biológica de oxígeno (DBO) capacidad microbiana del consumo de oxígeno en una muestra de agua

Desnitrificación respiración anaeróbica en la que el NO_3^- se reduce a compuestos nitregenados gaseosos

Drenaje ácido de las minas agua ácida que contine H_2SO_4 procedente de la oxidación microbiana de minerales de sulfuro de hierro

Ecosistema una comunidad de organismos en su medio natural

Fijación de nitrógeno reducción de N_2 a NH_3

Hidrotermal una fuente caliente de las profundidades marinas, o un manantial caliente

Gremio (*guild*) conjunto de poblaciones de microorganismos relacionados metabólicamente en un mismo lugar

Leghemoglobina una proteína captadora de O_2 de los nódulos radicales

Liquen un hongo y una alga (o cianobacteria) que viven en asociación simbiótica

Lixiviado solubilización y eliminación de metales de las menas minerales por ataque microbiano

Lixiviado microbiano eliminación por la actividad microbiana de metales valiosos como Cu^{2+} de menas de sulfuro

Micorriza asociación simbiótica entre un hongo y las raíces de una planta

Microambiente el medio inmediato que rodea una célula microbiana o un grupo de células

Nitrificación proceso por el que NH_3 es oxidado a NO_3^-

Nódulo radical crecimiento en forma de tumoración en raíces de plantas que contiene bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno

Óxico medio que contiene oxígeno, frecuentemente con un E_0' elevado

Pirita un mineral de hierro, el FeS_2

Plásmido Ti plásmido conjugativo presente en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* que puede transferir genes a las plantas

Plásticos microbianos (bioplásticos) polímeros biodegradables con propiedades similares a los plásticos sintéticos, obtenidos a partir de microorganismos

Productor primario organismo que usa la luz para sintetizar materia orgánica a partir de CO_2

Proteorrodopsina proteína sensible a la luz en algunos miembros del dominio *Bacteria* que cataliza la formación de ATP

Rizosfera región inmediatamente adyacente a las raíces de las plantas

Rumen el primer compartimento del estómago de los rumiantes en el que tiene lugar la digestión de la celulosa

Sintrofia proceso por el que dos o más microorganismos cooperan para llevar a cabo un proceso que ninguno de ellos puede realizar por separado

Transferencia interespecífica de hidrógeno la producción y consumo inmediato de H_2 por diferentes grupos de microorganismos que interaccionan estrechamente durante el catabolismo anaeróbico

Tubo de infección en la formación de nódulos radicales, el tubo de celulosa a través del cual las células de *Rhizobium* se desplazan hasta alcanzar e infectar las células de la raíz

Xenobiótico producto totalmente sintético que no se da en la naturaleza

---

Partiendo de lo expuesto en el Capítulo 18, de enfoque técnico, en éste vamos a examinar la actividad que llevan a cabo los microorganismos en sus hábitat. En un ecosistema, cada microorganismo interacciona con su medio y con otros organismos. De esas interacciones resultan cambios químicos significativos en el medio que, en algunos casos, van en detrimento de los organismos superiores, como por ejemplo en el drenado ácido de las minas. En otros casos, las reacciones que llevan a cabo los microorganismos son absolutamente esenciales para los organismos superiores, por ejemplo, los ciclos de elementos que generan formas de nutrientes inorgánicos esenciales para las plantas. En cualquiera de los casos, dañino o beneficioso, los microorganismos controlan en gran medida la actividad de la biosfera.

I ECOSISTEMAS MICROBIANOS

Empezaremos examinando las características generales de los ecosistemas microbianos, con especial atención al microambiente y a las superficies que son el hábitat del crecimiento microbiano. Vamos a considerar las condiciones que resultan óptimas para el crecimiento y la forma en que ese conocimiento puede ser explotado por sectores industriales y para su aplicación en medicina.

19.1 Poblaciones, gremios y comunidades

En un sistema microbiano, el crecimiento celular forma *poblaciones*. Las poblaciones metabólicamente relacionadas se denominan ***gremios*** (*guilds*), y los conjuntos de agrupaciones interaccionan formando *comunidades microbianas* (*véase* Figura 19.1), que interaccionan con comunidades de macroorganismos y con el ambiente, todo lo cual engloba y define el ecosistema.

La energía entra en el ecosistema en forma de luz solar, carbono orgánico y sustancias inorgánicas reducidas. Los organismos fototrofos utilizan la luz (*véanse* Secciones 17.1-17.5) para sintetizar nueva materia orgánica (*véase* Figura 19.1), que contiene, además de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, hierro y otros elementos. El nuevo material sintetizado, junto con la materia orgánica que penetra en el ecosistema desde el exterior (materia orgánica *alóctona*) impulsan la actividad metabólica de los organismos quimioorganotrofos. Por el contrario, los quimiolitotrofos obtienen su energía de donadores inorgánicos de electrones, como H_2, Fe^{2+}, S^0 o NH_3 (*véase* Capítulo 17).

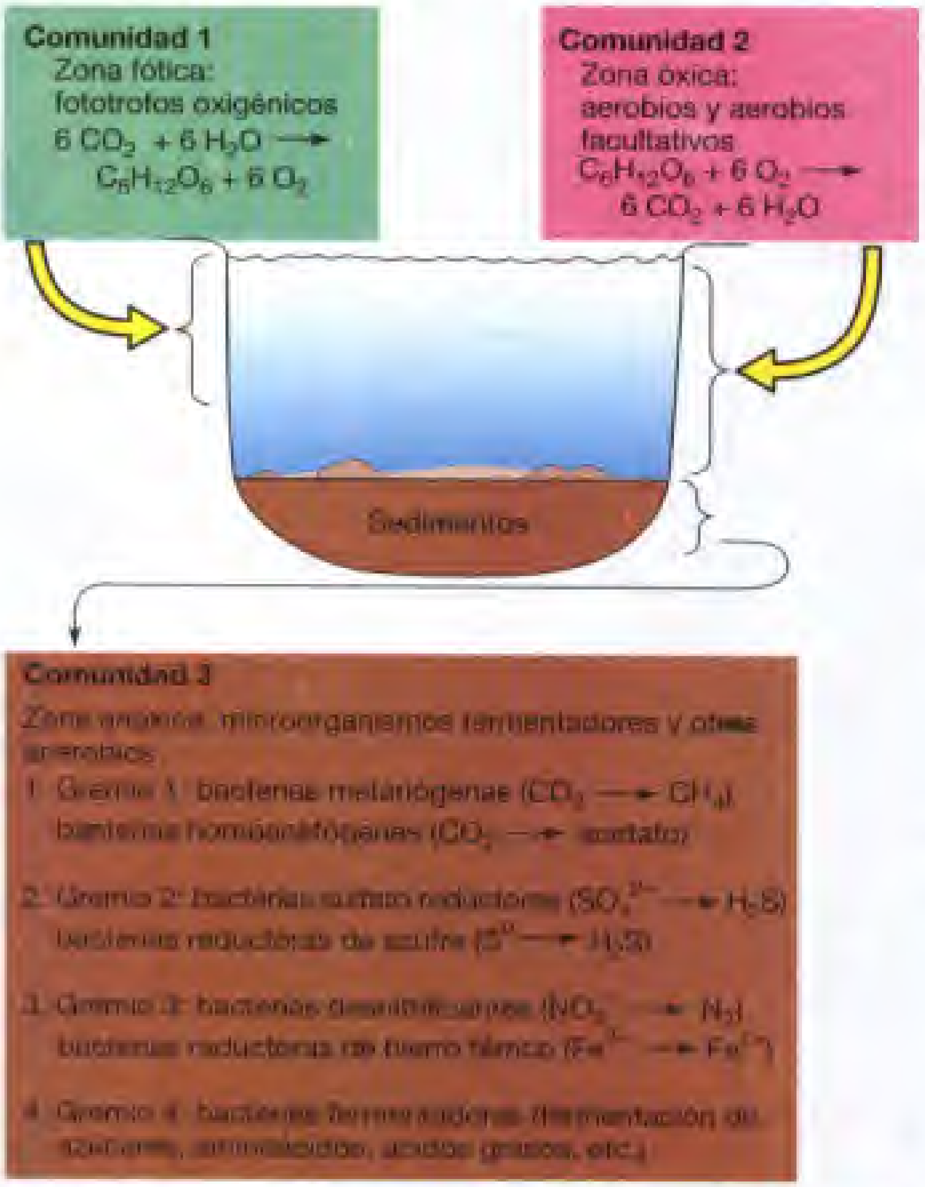

Comunidad 1
Zona fótica:
fototrofos oxigénicos
$6\ CO_2 + 6\ H_2O \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2$
Comunidad 2
Zona óxica:
aerobios y aerobios facultativos
$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \longrightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$
Sedimentos
Comunidad 3
Zona anóxica: microorganismos fermentadores y otros anaerobios
1. Gremio 1: bacterias metanógenas ($CO_2 \longrightarrow CH_4$) bacterias homoacetógenas ($CO_2 \longrightarrow$ acetato)
2. Gremio 2: bacterias sulfato reductoras ($SO_4^{2-} \longrightarrow H_2S$) bacterias reductoras de azufre ($S^0 \longrightarrow H_2S$)
3. Gremio 3: bacterias desnitrificantes ($NO_3^- \longrightarrow N_2$) bacterias reductoras de hierro férrico ($Fe^{3+} \longrightarrow Fe^{2+}$)
4. Gremio 4: bacterias fermentadoras (fermentación de azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, etc.)

Figura 19.1 Poblaciones, gremios y comunidades (un ejemplo de la estructura de una comunidad microbiana en un ecosistema lacustre). Las comunidades microbianas consisten en poblaciones de células de varias especies. En un ecosistema lacustre puede haber varias comunidades, tal como se muestra aquí. En el caso de las comunidades presentes en el sedimento, se muestran los principales gremios.

Ciclos biogeoquímicos

Los microorganismos tienen un papel clave en el reciclado de los elementos, especialmente en el caso del carbono, azufre, nitrógeno e hierro. Un **ciclo biogeoquímico** es el resultado del conjunto de los procesos biológicos y químicos durante el reciclado de estos elementos esenciales de los sistemas vivos. A menudo, esos ciclos implican reacciones de oxidación-reducción (*véase* Sección 5.6) a medida que el elemento se desplaza a través del ecosistema (*véase* Figura 19.1). Por ejemplo, el azufre en forma de sulfuro de hidrógeno (H_2S) es oxidado a azufre (S^0) y sulfato (SO_4^{2-}) por diferentes microorganismos, tanto fototrofos como quimiotrofos. El sulfato es un elemento esencial para la nutrición de las plantas. El sulfato puede ser reducido a su vez a sulfuro (cerrando así el ciclo biogeoquímico) por bacterias reductoras de sulfato. Microorganismos de diversos tipos intervienen decisivamente en el reciclado biogeoquímico y, en muchos casos, son los únicos agentes biológicos capaces de regenerar formas de elementos que necesitan otros organismos, especialmente las plantas. En este capítulo trataremos los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno, azufre y hierro.

✓ *19.1 Revisión de conceptos*

Las comunidades microbianas están compuestas por gremios de organismos relacionados metabólicamente. Los microorganismos participan activamente en las transformaciones de la energía y en los procesos biogeoquímicos que producen el reciclado de los elementos esenciales para los sistemas vivos.

- ✓ ¿En qué se diferencia un *gremio* de una *comunidad microbiana*?
- ✓ ¿Qué es un *ciclo biogeoquímico*?

19.2 Ambientes y microambientes

Los hábitat naturales de los microorganismos son extremadamente diversos. Cualquier hábitat que sea adecuado para el crecimiento de organismos superiores, también lo es para el crecimiento de microorganismos. Pero, además, hay muchos hábitat donde, debido a las condiciones físicas o químicas extremas, no se encuentran organismos superiores; sin embargo, en estos ambientes sí pueden existir microorganismos que, en algunos casos, incluso crecen mejor allí. Los microorganismos también habitan las superficies de organismos superiores y algunos pueden, incluso, vivir *en el interior* de plantas y animales. En dichos hábitat, sus poblaciones pueden ser muy numerosas y ser muy beneficiosos para la planta o el animal en relación con su nutrición. Nos centraremos ahora en el hábitat microbiano desde el punto de vista de los propios microorganismos, y destacaremos la naturaleza heterogénea y sujeta a cambios rápidos de los hábitat microbianos típicos.

El microorganismo y su microambiente

Como en los cultivos de laboratorio, el crecimiento de los microorganismos en la naturaleza depende de los *recursos* (nutrientes) disponibles y de las *condiciones* de crecimiento (*véase* Tabla 19.1). Las diferencias en el tipo y cantidad de los

TABLA 19.1 Principales recursos y condiciones que regulan el crecimiento microbiano en la naturaleza

Recursos	Condiciones
Carbono (orgánico, CO_2)	Temperatura: frío → templado → caliente
Nitrógeno (orgánico, inorgánico)	Potencial del agua: seco → húmedo → mojado
Otros macronutrientes (S, P, K, Mg)	pH: 0 → 7 → 14
Micronutrientes (Fe, Mn, Co, Cu, Zn, Mn, Ni)	O_2: óxico → microóxico → anóxico
O_2 y otros aceptores de electrones (NO_3^-, SO_4^{2-}, Fe^{3+}, etc.)	Luz: brillante → atenuada → oscuridad
Donadores de electrones inorgánicos (H_2, H_2S, Fe^{2+}, NH_4^+, NO_2^-, etc.)	Condiciones osmóticas: agua dulce → agua marina → hipersalinidad

diferentes recursos y en las condiciones fisicoquímicas de un hábitat definen el *nicho* de cada organismo en particular. La teoría ecológica indica que para cada organismo existe al menos un nicho, el *principal*, que es aquel en el que crece mejor. El mismo organismo puede habitar otros nichos, pero en ellos no tendrá tanto éxito como en el principal. En la Tierra existen incontables nichos microbianos y de ellos depende, en parte, la gran diversidad metabólica (*véase* Capítulo 17) de los microorganismos y la biodiversidad microbiana (*véanse* Capítulos 12-14) que se da en la actualidad.

Al ser los microorganismos muy pequeños, sus hábitat también lo son. Un microbiólogo debe, por tanto, aprender a «pensar en pequeño» cuando considere los microorganismos en su medio natural. Por ejemplo, para una bacteria con forma de bacilo típico de 3 mm de longitud, una distancia de 3 mm en su hábitat es lo mismo que para una persona una distancia de 2 km. Y a lo largo de esa distancia de 3 mm pueden darse gradientes físicos y químicos que afecten mucho al organismo. Por tanto, debemos precisar más en nuestra caracterización del hábitat de un microorganismo, y los ecólogos microbianos utilizan el término **microambiente** para referirse exactamente al lugar del hábitat en el que un microorganismo vive y lleva a cabo su metabolismo.

En una partícula de suelo de 3 mm, por ejemplo, pueden existir diversos tipos de microambientes, con características químicas y físicas muy diferentes. Pensemos, por ejemplo, en la distribución en una partícula de suelo de un nutriente microbiano importante, como es el oxígeno. Mediante electrodos (*véase* Sección 18.10) es posible medir la concentración de oxígeno en pequeñas partículas de suelo. Como se ve en los datos de un experimento real en la Figura 19.2, las partículas de suelo no son homogéneas en lo que respecta al contenido en oxígeno. La parte externa de una partícula de suelo puede ser completamente óxica, mientras que el centro, que se encuentra a una distancia muy corta, puede permanecer completamente anóxico (*véase* Figura 19.2). Esta comprobación indica que pueden darse diferentes nichos a lo largo de una dimensión espacial muy pequeña y explica cómo pueden coexistir microorganismos de varios tipos fisiológicos en un espacio muy pequeño. Los organismos anaerobios podrían desarrollar su actividad cerca del centro de la partícula de la Figura 19.2; los microaerófilos (aerobios que necesitan niveles muy bajos de oxígeno) podrían actuar más hacia el exterior; y los aerobios estrictos desarrollarían su actividad metabólica en los 2 o 3 mm externos de la partícula. Las bacterias aerobias facultativas podrían hallarse distribuidas por toda la partícula (*véase* Sección 6.13).

En un microambiente, las condiciones fisicoquímicas pueden cambiar rápidamente en cuanto al tiempo y al espacio. Las concentraciones de oxígeno mostradas en la Figura 19.2 representan únicamente medidas «instantáneas»; las tomadas a lo largo de un periodo de respiración microbiana, o después de aumentar el contenido de agua en el suelo, presentarían un gradiente completamente distinto a lo largo del microambiente. Hay que decir, por tanto, que los microambientes son *heterogéneos*, y que las condiciones en un determinado microambiente pueden cambiar muy deprisa. De esta forma, los microambientes contribuyen al aumento de la diversidad microbiana en un espacio físico relativamente pequeño.

Niveles de nutrientes y velocidad de crecimiento

A menudo, los nutrientes (o, en términos ecológicos, los *recursos*, *véase* Tabla 19.1) entran en el ecosistema de manera intermitente. Un gran aporte de nutrientes (por ejemplo,

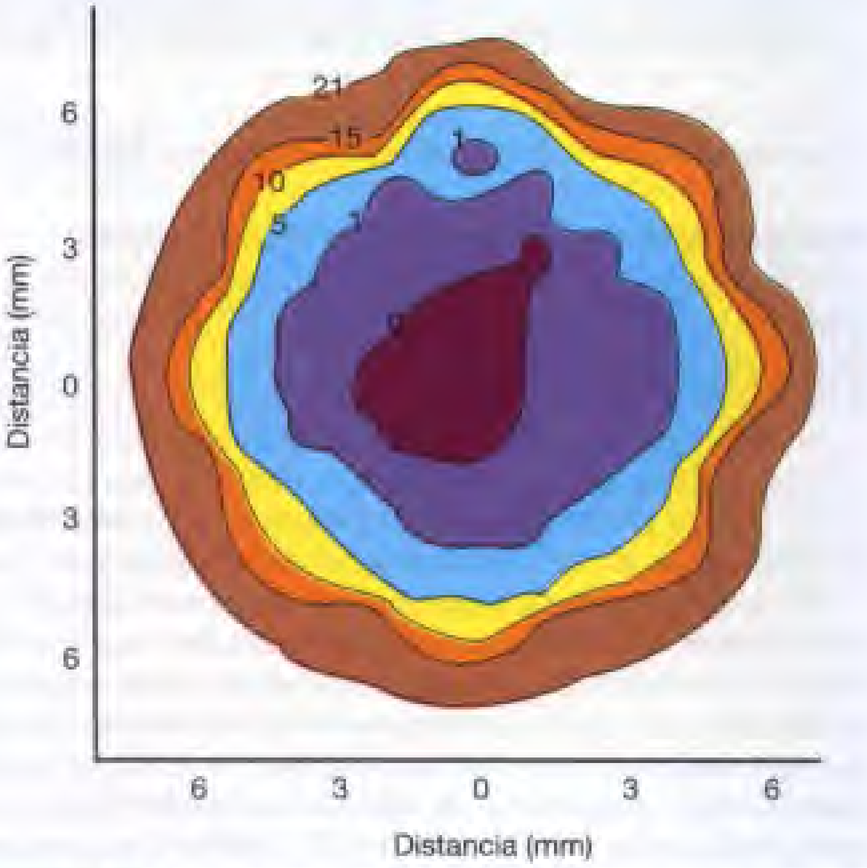


Figura 19.2 Mapa del perfil de las diferentes concentraciones de O_2 en una partícula de suelo. Los ejes muestran las dimensiones de la partícula. Los números de los perfiles son concentraciones de O_2 (en porcentaje; el aire tiene 21% de O_2). De acuerdo con las relaciones de los microorganismos con el oxígeno, cada zona puede considerarse un microambiente diferente.

una acumulación de hojarasca o el cadáver de un animal) puede ir seguido de un periodo de fuerte escasez de nutrientes. En la naturaleza, los microorganismos suelen llevar un tipo de existencia donde situaciones de gran abundancia de alimentos se alternan con otras de «escasez de nutrientes», por lo que han desarrollado sistemas bioquímicos de producción de polímeros que pueden almacenar como material de reserva. Estos polímeros acumulan los nutrientes en exceso que se encuentran durante los periodos de crecimiento favorable para utilizarlos durante las épocas de escasez. Ejemplos de materiales de reserva son el poli-β-hidroxibutirato y otros alcanoatos, los polisacáridos, el polifosfato, etc. (*Véase* Sección 4.13.)

La fase de crecimiento exponencial no suele prolongarse mucho tiempo en el medio natural. El crecimiento suele producirse en etapas o periodos, que están relacionados estrechamente con la disponibilidad de nutrientes. Dado que las condiciones fisicoquímicas óptimas no suelen darse simultáneamente, la velocidad de crecimiento de los microorganismos en el medio natural suele estar muy por debajo de las velocidades máximas que se alcanzan en el laboratorio. Por ejemplo, el tiempo de generación de *Escherichia coli* en el intestino suele ser de 12 h (la población se duplica dos veces cada día), mientras que en cultivo axénico crece mucho más deprisa, con un tiempo de generación que puede ser de tan sólo 20 minutos en condiciones óptimas. El cálculo de la velocidad de crecimiento de algunas bacterias que viven en el suelo demuestra que en la naturaleza no alcanzan el 1% de la velocidad de crecimiento máxima obtenida en el laboratorio. Por término medio, la disminución de la velocidad de crecimiento refleja: (1) que la disponibilidad de nutrientes (recursos, *véase* Tabla 19.1) suele ser baja; (2) que la distribución de dichos nutrientes a lo largo del hábitat microbiano no es uniforme, y (3) salvo raras excepciones, que los microorganismos no se encuentran en cultivo axénico en los medios naturales y que por tanto han de enfrentarse a los efectos competitivos de otros microorganismos.

Competencia y cooperación microbianas

La competencia entre microorganismos por los recursos disponibles puede ser intensa, por lo que el resultado final depende de varios factores, entre los que están la tasa de incorporación de nutrientes, las tasas metabólicas inherentes y, en última instancia, la velocidad de crecimiento. Un hábitat típico alberga una mezcla de microorganismos diferentes (*véase* Figura 19.1), y la densidad de cada población dependerá del grado de semejanza del hábitat al nicho principal.

En vez de competir por el mismo nutriente, algunos microorganismos colaboran para llevar a cabo una transformación determinada que ninguno de esos organismos podría realizar por sí mismo. Este tipo de interacciones microbianas, que se denomina *sintrofia* (*véase* Sección 17.21) es crucial para el éxito competitivo de algunas bacterias anaeróbicas, como se describe en la Sección 19.10. También se aprecia cooperación metabólica en grupos de organismos que llevan a cabo metabolismos *complementarios*. Por ejemplo, en el Capítulo 17 se trataron las transformaciones metabólicas en las que participan dos grupos distintos de microorganismos, como son las bacterias *nitrosificantes* y las bacterias *nitrificantes*, que se combinan para oxidar el NH_3 a NO_3^-, proceso que ninguno de los dos grupos podría realizar por separado (*véase* Sección 17.12). Como la producción de las bacterias nitrosificantes (NO_2^-) es el sustrato para las nitrificantes, estos organismos viven por lo general en estrecha asociación (*véase* Figura 18.12*a*).

✓ 19.2 Revisión de conceptos

Los microorganismos son muy pequeños, al igual que lo son los diferentes medios donde se desarrollan. Se denomina microambiente el lugar donde vive específicamente un microorganismo. En la naturaleza, los microorganismos llevan a menudo una vida de abundancia-escasez, de manera que sólo las especies más adaptadas sobreviven en un nicho dado. La cooperación entre microorganismos resulta esencial en muchas de las interrelaciones microbianas.

- ✓ ¿Qué aspectos definen el nicho de un microorganismo particular?
- ✓ ¿Por qué muchos grupos de organismos distintos fisiológicamente viven en un único hábitat?

19.3 Crecimiento microbiano en superficies y biofilmes

Las superficies suelen tener considerable importancia como hábitat microbianos debido a que adsorben nutrientes. En el microambiente de una superficie, las concentraciones de nutrientes pueden ser muy superiores a las de toda la solución. Como consecuencia, la concentración de microorganismos que crecen en una superficie suele ser mayor que la concentración de los que viven en el agua.

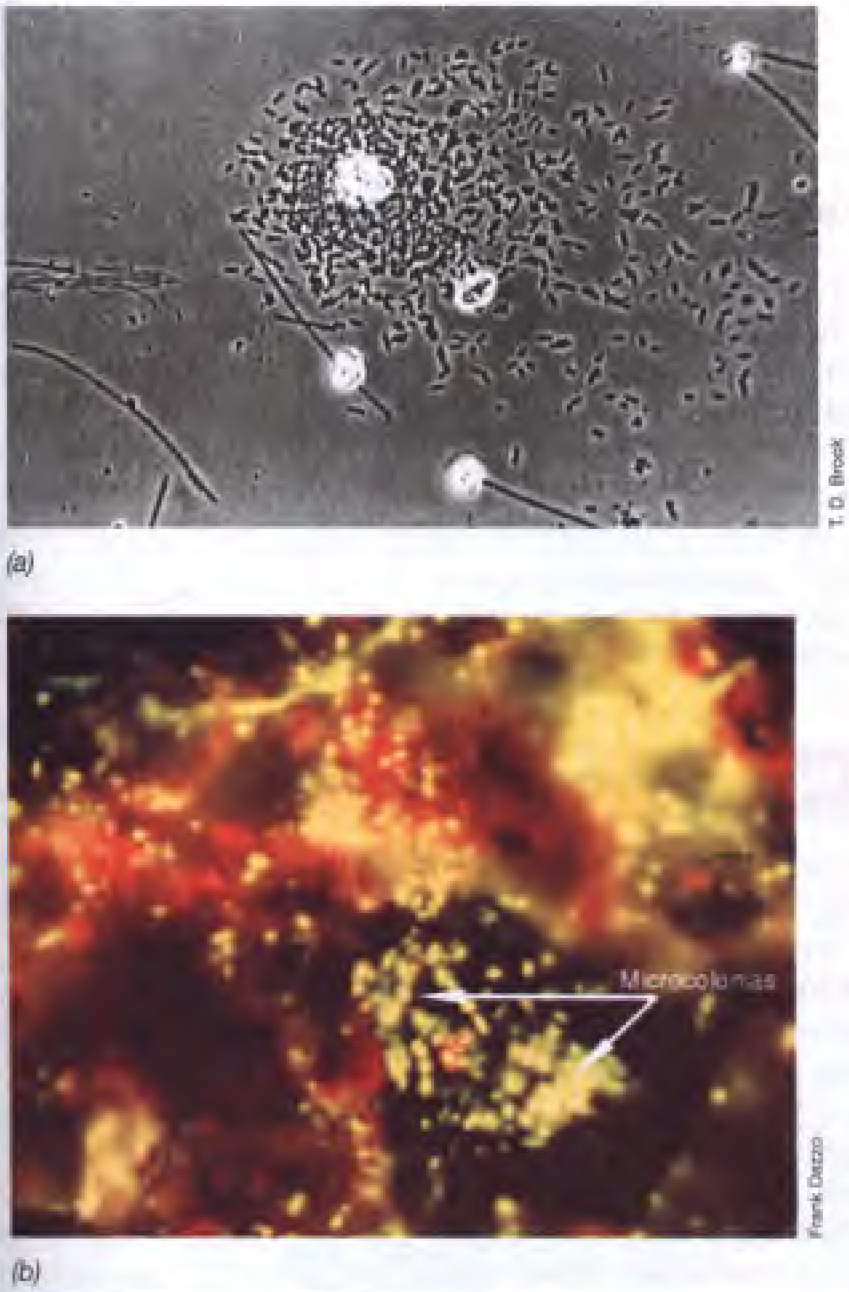
Los portaobjetos sirven de superficies experimentales sobre las cuales se adhieren y crecen los organismos. Si se sumerge un portaobjetos en un hábitat microbiano, se le deja durante un tiempo y luego se examina al microscopio, se hace evidente la importancia de la superficie para el crecimiento de los microorganismos (Figura 19.3*a*). Sobre dichas superficies se desarrollan rápidamente microcolonias, de la misma manera que lo hacen en las superficies naturales. La velocidad de crecimiento de microorganismos adheridos a una superficie en la naturaleza puede medirse mediante el examen microscópico periódico de portaobjetos sumergidos.

La superficie de adherencia puede ser también un nutriente, como ocurre con las partículas de materia orgánica, donde los microorganismos adheridos catabolizan los nutrientes directamente de la superficie de la partícula. El material procedente de plantas muertas, por ejemplo, es colonizado muy pronto por los microorganismos del suelo, y mediante técnicas sencillas de tinción se detectan poblaciones microbianas adheridas a la superficie sólida (Figura 19.3*b*).

Biofilmes: estructura

Los microorganismos crecen incluidos en **biofilmes**. Son microcolonias revestidas de células bacterianas adosadas a una superficie mediante polisacáridos adhesivos excretados por las propias células (Figura 19.4). Los biofilmes atrapan nutrientes para el crecimiento de las poblaciones microbianas y ayudan a impedir el desprendimiento de las células que crecen sobre las superficies expuestas a corrientes de líquido (Figura 19.5). Los biofilmes presentan típicamente numerosas capas de microorganismos, cada una de las cuales pueden ser observadas por microscopía láser confocal (*véanse* Sección 3.2 y Figura 19.4).

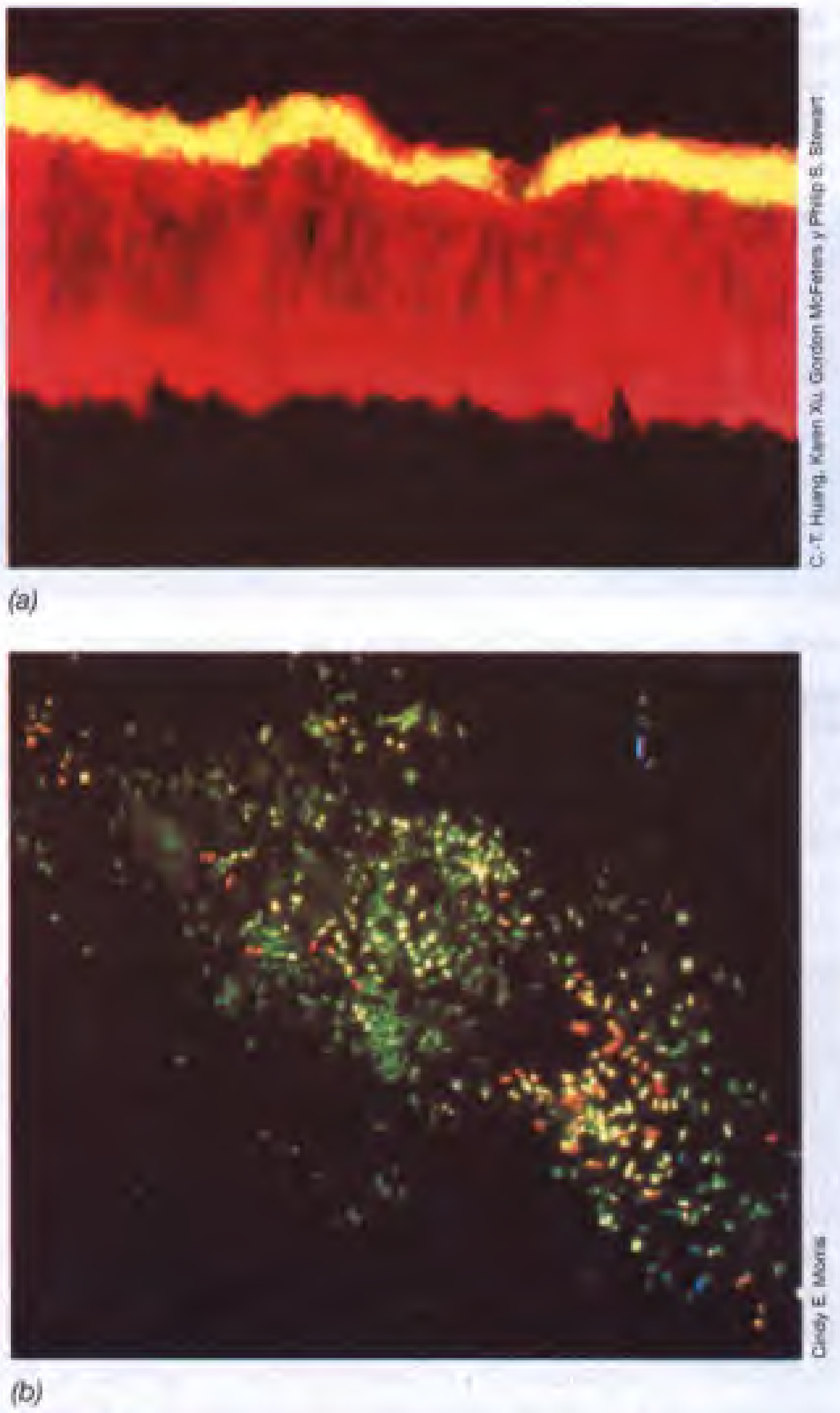
La comunicación célula a célula es esencial en el desarrollo y mantenimiento de un biofilme. La adherencia de una célula a una superficie es una señal para la expresión de genes específicos de un biofilme. Estos genes codifican proteínas que sintetizan moléculas que actúan como señales para la unión célula a célula y el inicio de la formación de polisacárido (*véase* Figura 19.5). En *Pseudomonas aeruginosa*, notable formadora de biofilmes (Figura 19.4*a*), las moléculas que actúan como señal son compuestos denominados *homoserina lactonas.* A medida que se van acumulando, estas moléculas actúan como agentes quimiotácticos que atraen células de *P. aeruginosa* mediante un mecanismo denominado ***percepción de quorum*** (*quorum sensing*) (*véase* Sección 8.10), dando lugar al desarrollo del biofilme (Figura 19.4*a*). *P. aeruginosa* interviene en la *fibrosis quística*, enfermedad debida a la formación de un biofilme en los pulmones, cuyos síntomas son parecidos a la neumonía.



T. D. Brock

Frank Dazzo

Figura 19.3 Microorganismos sobre superficies. (a) Desarrollo de microcolonias bacterianas sobre un portaobjetos sumergido en un río pequeño. Las partículas brillantes son materia mineral. Las células bacilares cortas tienen unas 3 µm de longitud. (b) Fotomicrografía de fluorescencia de una comunidad microbiana que coloniza las raíces de una planta. Obsérvese el desarrollo de microcolonias. La preparación se ha teñido con naranja de acridina.



C.-T. Huang, Karen Xu, Gordon McFeters y Philip S. Stewart

Cindy E. Morris

Figura 19.4 Biofilmes microbianos. (a) Sección transversal de un biofilme experimental de células de *Pseudomonas aeruginosa*. La capa de tonalidad amarillo-verdoso (de unos 15 µm de profundidad) contiene células y su tinción se debe a la actividad enzimática de la enzima fosfatasa alcalina. (b) Microscopía láser confocal de barrido (*véase* Sección 4.2) de un biofilme natural (visto desde encima) desarrollándose sobre la superficie de la hoja de una planta. El color de las células indica su profundidad en el biofilme: rojo, células en la superficie; verde, a 9 µm; azul, a 18 µm.

Biofilmes: consecuencias y control

El desarrollo de biofilmes tiene implicaciones significativas en la salud humana y en diversas industrias (por ejemplo, en la industria alimentaria o cosmética). En el cuerpo, las células bacterianas de un biofilme se encuentran protegidas ante ataques del sistema inmunitario y los antibióticos, y otros agentes antimicrobianos, suelen fracasar en su intento de penetrar en el biofilme. Además de en la fibrosis quística, los biofilmes aparecen en diversas alteraciones dentales, entre ellas la periodontitis, en la formación de cálculos en el riñón, en la tuberculosis, en la legionelosis y en infecciones por *Staphylococcus*. Los implantes médicos son también, por desgracia, medios excelentes para el desarrollo de biofilmes. Entre ellos se incluyen los catéteres urinarios, así como los implantes a largo plazo tales como las

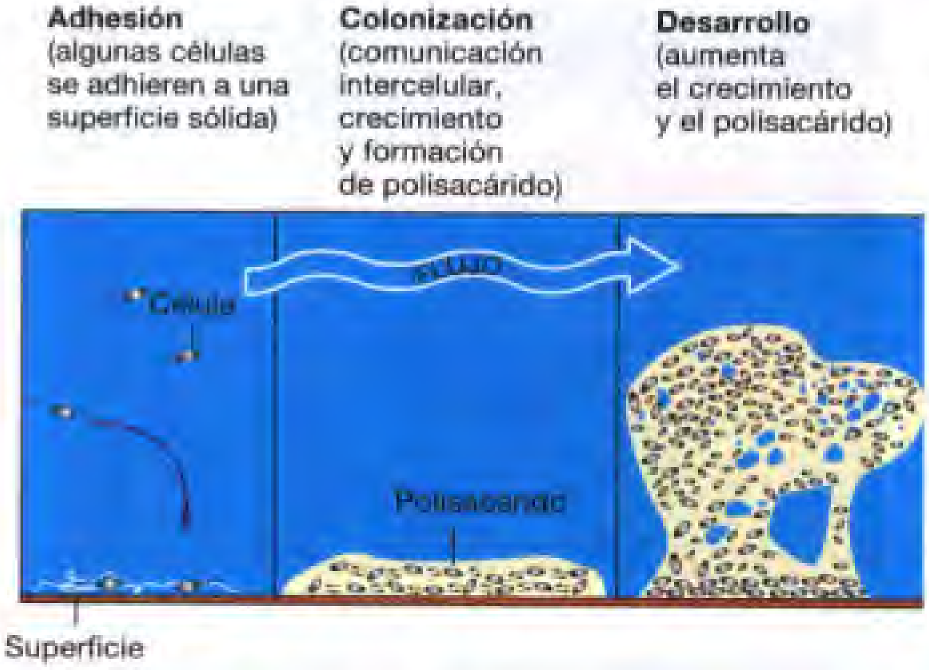

Adhesión
(algunas células se adhieren a una superficie sólida)
Colonización
(comunicación intercelular, crecimiento y formación de polisacárido)
Desarrollo
(aumenta el crecimiento y el polisacárido)
Flujo
Célula
Polisacárido
Superficie

Figura 19.5 Formación de un biofilme bacteriano. El biofilme se inicia con la adherencia de algunas células, tras lo cual se desarrolla el crecimiento y la comunicación celular. El polisacárido se va formando y extendiendo a medida que crece el biofilme.

articulaciones artificiales. Se estima que en Estados Unidos, 10 millones de personas al año sufren infecciones por biofilmes debidas a implantes u otros procedimientos médicos intrusivos. Los biofilmes son la razón de que la rutina en la higiene dental sea tan importante. La placa dental es un biofilme típico y contiene bacterias productoras de ácido responsables de la caries dental (*véase* Sección 21.3).

En la industria, los biofilmes pueden reducir el flujo de agua, aceite o cualquier otro líquido que circule a través de tuberías y acelerar la corrosión de los propios tubos. También inician la degradación de los objetos sumergidos, tales como componentes estructurales de plataformas petrolíferas, barcos e instalaciones costeras. La calidad del agua potable puede verse amenazada por los biofilmes que se forman en los conductos de distribución, algunos de los cuales, en Estados Unidos, tienen de 50 a 100 años. Aunque las bacterias que se encuentran en los conductos de agua son en su mayoría inocuas, si algunos patógenos consiguieran colonizar el biofilme, la cloración estándar podría ser insuficiente para matarlos. La liberación periódica de células puede llevar a brotes de enfermedad. Existe preocupación por la posibilidad de que *Vibrio cholerae*, el agente causante del cólera (*véase* Sección 28.6), pueda ser dispersado de esta manera.

El control de biofilmes requiere un gran esfuerzo y hasta el momento sólo se dispone de un repertorio limitado de instrumentos para combatirlos. La industria dedica miles de millones cada año al tratamiento de tuberías y otras superficies para mantenerlas limpias de biofilmes. En la estrategia de lucha contra estos invasores, se incluye el descubrimiento de nuevos antibióticos capaces de penetrar en ellos y fármacos que interfieran en la comunicación intracelular y la consecuente formación de biofilmes. En este último aspecto hay una clase de productos químicos, las *furanonas*, que en las pruebas experimentales han dado resultados alentadores. Como las furanonas son compuestos estables y no tóxicos para los humanos, también pueden tener aplicación como agentes antibiofilme en medicina.

✓ 19.3 Revisión de conceptos

Los biofilmes son microcolonias de bacterias incluidas en una capa mucosa que se forma sobre una superficie. Pueden llevar a la destrucción tanto de superficies inertes como vivas, a partir de los productos excretados de las células bacterianas. La formación de biofilmes es un proceso complejo en el que interviene la comunicación de célula a célula.

- ✓ ¿Cuál es la naturaleza química de una matriz de biofilme?
- ✓ ¿Por qué un biofilme es un buen hábitat para las células bacterianas de un sistema de corrientes?
- ✓ Proporciónese un ejemplo de biofilme de importancia médica que tienen la mayoría de los humanos

II HÁBITAT MICROBIANOS TERRESTRES Y DE AGUA DULCE

Entre los hábitat principales de los microorganismos están los suelos y las masas de agua dulce, entre las que se encuentran lagos, estanques y ríos. ¿Por qué una muestra de suelo o de agua de un hábitat contiene grandes cantidades de microorganismos, mientras que la de otro hábitat tiene relativamente pocos? Suelos y agua varían en su estructura física, composición de nutrientes, temperatura y potencial de agua. Todos estos factores se combinan para influir en los tipos y número de microorganismos presentes, de manera que nuestra discusión aquí se centrará en estos factores y en la forma en que controlan las poblaciones microbianas del suelo y del agua.

19.4 Ambientes terrestres

Al considerar los ambientes terrestres, nuestra atención se dirige indefectiblemente hacia el suelo y las plantas, porque es donde tienen lugar los procesos determinantes para el funcionamiento del ecosistema. En la formación del suelo se producen interacciones complejas entre el material original (roca, arena, sedimentos, etc.), la topografía del terreno, el clima y los seres vivos. Los suelos pueden clasificarse en dos amplios grupos —**suelos minerales** y **suelos orgánicos**— según procedan, inicialmente, de la fragmentación de rocas y otros materiales inorgánicos, o de la sedimentación en turberas y marismas. Trataremos principalmente los suelos minerales, los más abundantes en la mayoría de las regiones.

Formación del suelo

Los suelos se forman como resultado de una combinación de procesos físicos, químicos y biológicos. El examen de cualquier roca expuesta a la intemperie revela casi siempre la presencia de algas, líquenes (*véase* Figura 19.54) o musgos. Estos organismos pueden permanecer en estado de latencia sobre la roca seca y desarrollarse cuando hay humedad. Son fototróficos y producen materia orgánica, lo que permite el crecimiento de bacterias quimioorganotróficas y hongos. El número de quimioorganotrofos aumenta proporcionalmente a la extensión de la cubierta vegetal de la roca. El dióxido de carbono que producen los organotrofos durante la respiración se convierte en ácido carbónico ($CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$), que es un agente importante en la disolución de las rocas, especialmente en las que son calizas. Muchos quimioorganotrofos también secretan ácidos orgánicos, que a su vez causan la disolución de la roca en partículas de menor tamaño.

Las heladas, el deshielo y otros procesos físicos originan la formación de grietas en las rocas. En estas hendiduras se forma un suelo primitivo, sobre el cual pueden desarrollarse plantas superiores. Las raíces de las plantas van penetrando por las hendiduras y aumentan la fragmentación de la roca, y sus excreciones causan el desarrollo de una **rizosfera** (el suelo que rodea las raíces de las plantas). Cuando las plantas mueren, sus restos pasan a formar parte del suelo y se convierten en nutrientes para un desarrollo microbiano más extenso. Los minerales se solubilizan aún más y el agua, al filtrarse, arrastra algunas de esas sustancias hacia capas más profundas. A medida que avanza la meteorización del suelo, éste se hace más profundo y permite el desarrollo de plantas y árboles de mayor tamaño. Los animales del suelo se estabilizan y desempeñan un importante papel en el mantenimiento de la aireación y mezcla de las capas superiores del suelo. Finalmente, el movimiento de materiales hacia el interior origina la formación de distintas capas y aparece un *perfil de suelo* típico (Figura 19.6), cuya velocidad de formación depende del clima y de otros factores, aunque suele ser un proceso lento, de cientos de años.

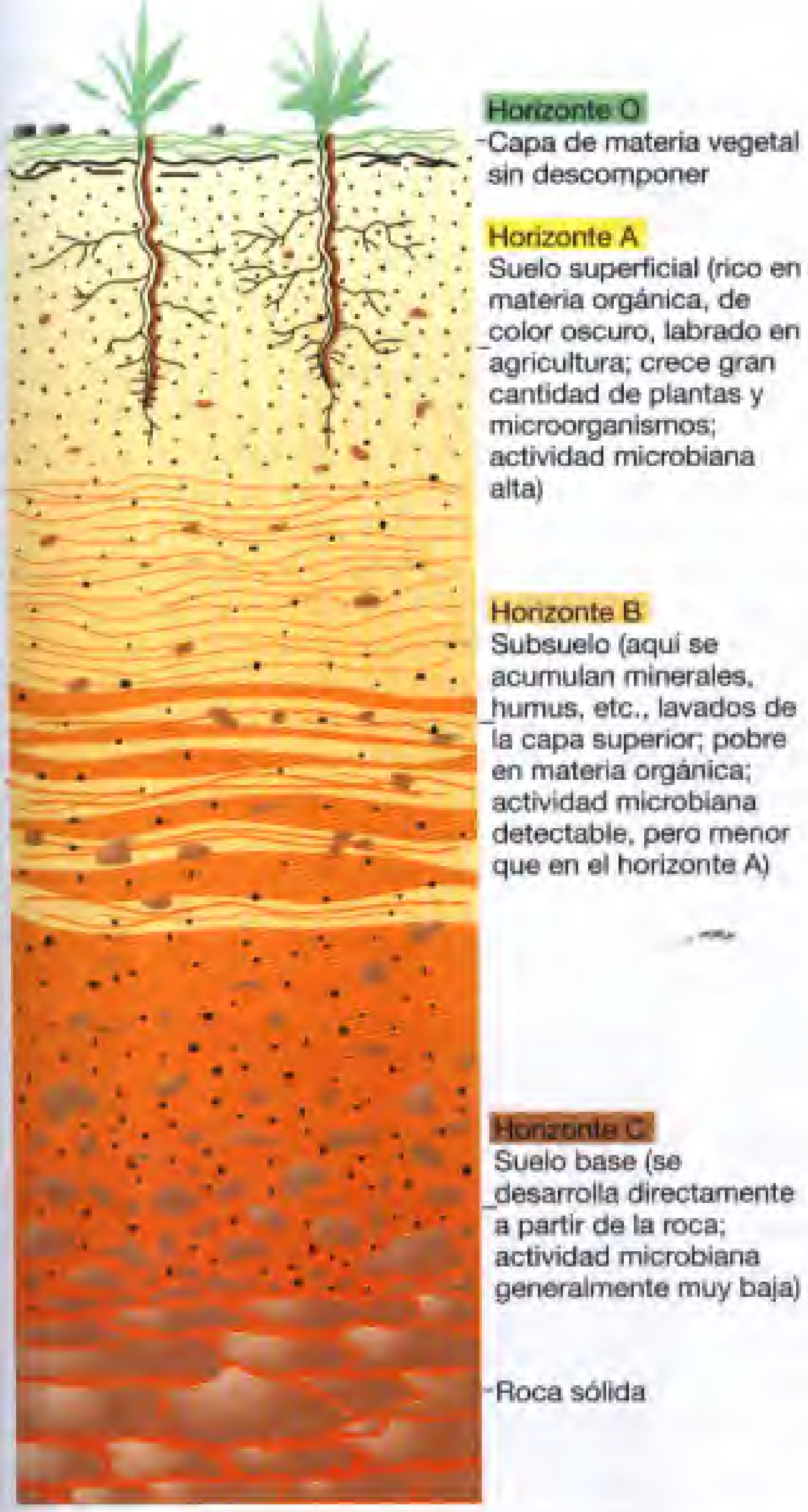

Horizonte O
Capa de materia vegetal sin descomponer
Horizonte A
Suelo superficial (rico en materia orgánica, de color oscuro, labrado en agricultura; crece gran cantidad de plantas y microorganismos; actividad microbiana alta)
Horizonte B
Subsuelo (aquí se acumulan minerales, humus, etc., lavados de la capa superior; pobre en materia orgánica; actividad microbiana detectable, pero menor que en el horizonte A)
Horizonte C
Suelo base (se desarrolla directamente a partir de la roca; actividad microbiana generalmente muy baja)
Roca sólida

Figura 19.6 Perfil de un suelo maduro. Los horizontes son las zonas del suelo que definen los especialistas.

El suelo como hábitat microbiano

El crecimiento microbiano más importante tiene lugar en la *superficie* de las partículas del suelo, normalmente en la rizosfera (*véanse* Figuras 19.2 y 19.3*b*). Como se ha destacado en la Sección 19.2, incluso un pequeño agregado de suelo contiene microambientes muy diferentes (compárese Figuras 19.2 y 19.7); por tanto, podrán encontrarse diferentes tipos de microorganismos. Para examinar directamente las partículas de suelo en busca de microorganismos suele utilizarse el microscopio de fluorescencia, aplicando una tinción fluorescente (*véase* Figura 19.3*b*) a los organismos del suelo. Para observar un microorganismo *específico* en una partícula de suelo puede usarse la tinción con anticuerpos fluorescentes (*véase* Figura 18.8) o la tinción filogenética (*véase* Sección 18.4). Para observar los microorganismos sobre superficies opacas se utiliza también el microscopio electrónico de barrido (Figura 19.8). Este tipo de microscopio proporciona excelente información sobre la morfología de las bacterias del suelo y puede utilizarse

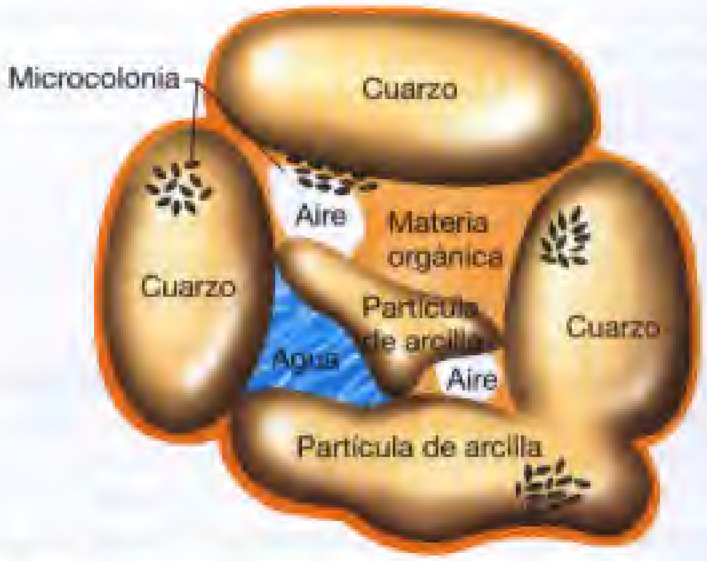

Microcolonia
Cuarzo
Aire
Materia orgánica
Cuarzo
Partícula de arcilla
Cuarzo
Agua
Aire
Partícula de arcilla

Figura 19.7 Un agregado de suelo, integrado por minerales y componentes orgánicos, mostrando la localización de microorganismos del suelo. Son muy pocos los microorganismos que se encuentran libres en el agua intersticial; la mayoría forman microcolonias adheridas a las partículas del suelo.

UNIVERSIDAD DE TALCA
BIBLIOTECA CENTRAL

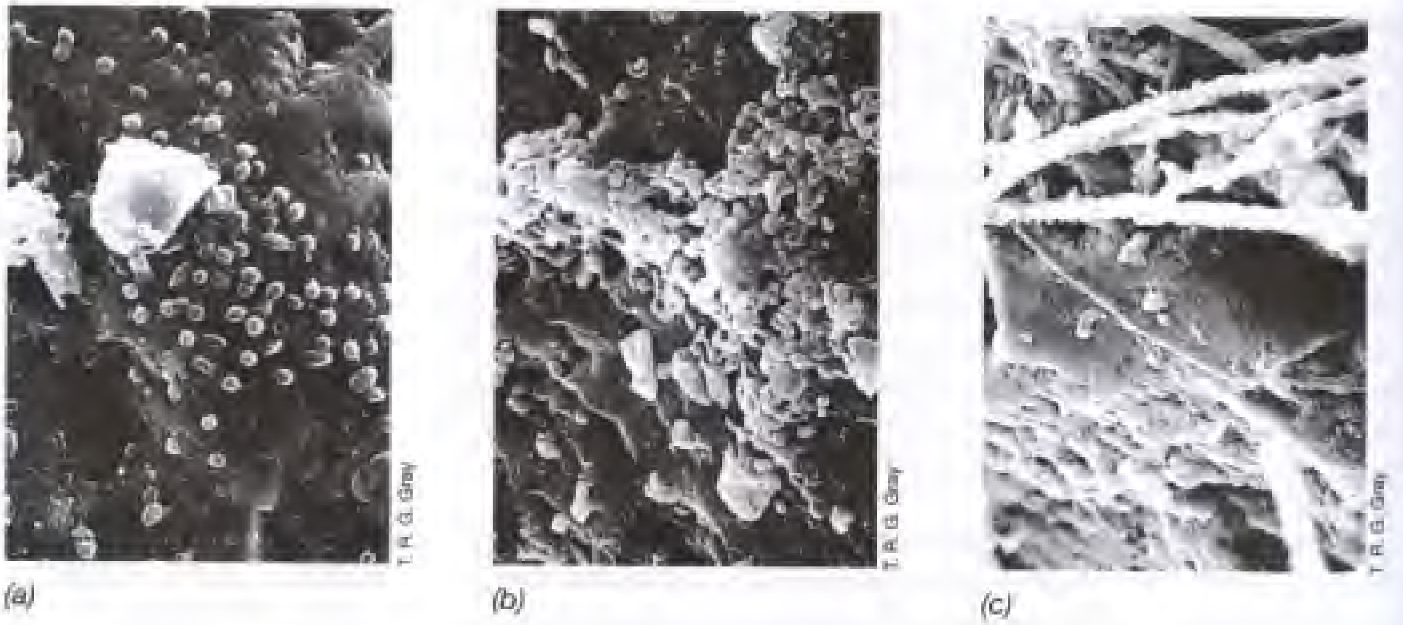


Figura 19.8 Micrografías electrónicas de barrido de microorganismos adheridos a la superficie de partículas del suelo. (a) Microcolonia de bacterias bacilares cortas. (b) Esporas de actinomicetos (véase Sección 12.25). Las células en (a) y las esporas en (b) tienen aproximadamente 1-2 µm de ancho. (c). Hifas fúngicas. Tienen unos 4 µm de ancho y están cubiertas de material mineral.

también para los recuentos de células que viven sobre las partículas de tierra.

Uno de los principales factores que influyen en la actividad microbiana es la disponibilidad de *agua*, y ya hemos visto la importancia del agua para el crecimiento microbiano (*véase* Sección 6.12). El agua es un componente del suelo que presenta una gran variabilidad, y su presencia depende de la composición del suelo, la lluvia, el drenaje y la cubierta vegetal. El agua permanece en el suelo de dos maneras: por adsorción sobre las superficies y como agua libre formando láminas o películas entre las partículas del suelo. El agua del suelo contiene diversos materiales disueltos, cuya mezcla se conoce como *solución del suelo*. En terrenos bien drenados el aire penetra con facilidad y la concentración de oxígeno puede ser alta. En suelos encharcados, sin embargo, el único oxígeno es el que está disuelto en el agua, y es consumido pronto por los microorganismos. Este tipo de suelos se vuelve pronto anóxico, por lo que experimenta cambios profundos en sus propiedades biológicas. En la Sección 19.2 y en la Figura 19.2 se han tratado las relaciones con el oxígeno en los microambientes del suelo.

El *estado nutricional* (*véase* Tabla 19.1) de un suelo es otro factor importante que afecta a la actividad microbiana. La mayor parte de ésta se lleva a cabo en las capas de la superficie ricas en materia orgánica, especialmente en la rizosfera y sus alrededores. El número de microorganismos del suelo, así como su actividad, dependen en gran parte del equilibrio de los nutrientes presentes. En algunos suelos el carbono no es el nutriente limitante, sino que es la disponibilidad de nutrientes *inorgánicos*, tales como el fósforo y el nitrógeno, lo que limita la productividad microbiana.

Microbiología de la subsuperficie profunda

El interés por la química de las aguas freáticas y la posibilidad de lixiviado de contaminantes que podrían alcanzar los acuíferos ha hecho considerar la función de los microorganismos en la *subsuperficie profunda* del ambiente terrestre. En esta subsuperficie, que puede extenderse cientos de metros por debajo de la superficie del suelo, también hay microorganismos. Aunque el número de células es mucho menor que en el horizonte A, en la mayoría de los suelos profundos se encuentra una gran variedad de microorganismos, principalmente bacterias. Por ejemplo, en muestras recogidas asépticamente a profundidades de 300 m en pozos de perforación se ha hallado un conjunto diverso de bacterias que incluye anaerobios estrictos, como bacterias sulfato reductoras, metanógenos y homoacetógenos (*véanse* Secciones 17.15-17.17), y diversos aerobios y anaerobios facultativos. Los microorganismos que habitan esos ambientes profundos deben de tener acceso a nutrientes porque el agua llega hasta sus hábitat, pero la medición de la actividad indica que la tasa metabólica de estas bacterias es bastante inferior a la que se da en sus hábitat naturales (*véase* Cuadro de texto «Vida microbiana en las profundidades de la Tierra»). Comparado con los microorganismos de las capas superiores del suelo, la importancia biogeoquímica de los microorganismos de ambientes más profundos puede que sea mínima. No obstante, hay pruebas de que la actividad metabólica prolongada de esos microorganismos que viven enterrados pueden causar la mineralización de compuestos orgánicos y liberar productos a las aguas subterráneas.

El potencial que representan estas bacterias (*véase* Sección 19.18) para el Biorremedio *in situ* de las sustancias tóxicas que alcanzan las aguas subterráneas por lixiviación (por ejemplo, bencenos y productos químicos utilizados en agricultura) tiene un gran interés en la actualidad. El biorremedio podría hacerse mediante la adición de materia inorgánica para estimular la biodegradación de esos productos químicos, o mediante la introducción de microorganismos específicos en acuíferos contaminados para estimular acciones biodegradadoras, o por ambos procedimientos.

✓ 19.4 Revisión de conceptos

El suelo es un hábitat complejo con numerosos microambientes y nichos. En las partículas del suelo es donde se adhieren principalmente los microorganismos presentes en ese medio. La disponibilidad de agua es lo que más influye en la actividad microbiológica que tiene lugar en la superficie del suelo, mientras que en el interior del suelo (en el ambiente de la subsuperficie), la disponibilidad de nutrientes es el factor principal.

- ✓ ¿Cuál es la diferencia entre suelos *minerales* y suelos *orgánicos*?
- ✓ ¿Qué factores rigen la extensión y el tipo de actividad microbiana en los suelos?

Atención a... Vida microbiana en las profundidades de la Tierra

Los microbiólogos que estudian la subsuperficie profunda de la Tierra han hallado procariotas viables a varios miles de metros de profundidad bajo la superficie, en ambientes con diferentes condiciones químicas y físicas. ¿De qué viven esos microorganismos? Los primeros hallazgos indicaban que eran bacterias quimioorganotróficas de crecimiento muy lento, que sobrevivían gracias al lento catabolismo del carbono orgánico depositado entre los sedimentos. Sin embargo, el estudio de la ecología microbiana de los acuíferos del basalto profundo[1] ha demostrado que esos perezosos quimioorganotrofos no son los únicos procariotas que viven en las profundidades.

El basalto es una roca volcánica rica en hierro que está esencialmente desprovista de materia orgánica. En algunas formaciones de basalto de hasta 1.500 metros de profundidad en la cuenca del río Columbia (Washington, EE UU), se ha encontrado una gran cantidad de bacterias anaeróbicas quimiolitotróficas (Figura 1*a*), que son sulfato reductores, metanógenos y homoacetógenos[1]. El análisis del isótopo estable del carbono del metano (CH_4) presente en las rocas y en las aguas circundantes ha demostrado que estos organismos son metabólicamente activos; las medidas obtenidas indican una gran abundancia del isótopo más ligero (^{12}C), lo que es típico de la metanogénesis biológica (*véase* Sección 18.11). Si los metanógenos están activos, es probable que otros grupos de microorganismos también lo estén. Sus productos, H_2S de los reductores de sulfato y acetato, de los homoacetógenos (*véase* Figura 1*b*), no se acumulan porque son consumidos activamente por otros microorganismos.

Estos anaerobios comparten una gran apetencia por H_2, que es un excelente donador de electrones para sus correspondientes metabolismos productores de energía (*véanse* Secciones 17.9, 17.14-17.18 y Figura 1*b* al pie de esta página). El hidrógeno es un producto corriente de la descomposición anóxica de la materia orgánica (*véanse* Secciones 17.19-17.21). Pero si el basalto contiene muy poca materia orgánica, ¿de dónde procede el H_2 necesario para sustentar el metabolismo de los organismos que lo consumen? Curiosamente, el H_2 del basalto del río Columbia parece originarse de la interacción, estrictamente química, del agua con los minerales de hierro de las rocas (*véase* la reacción propuesta en Figura 1*b*). Son reacciones ya conocidas de la química inorgánica; en los estudios llevados a cabo en el laboratorio se mezcló basalto del río Columbia triturado con agua estéril en condiciones anóxicas y se produjo rápidamente H_2[1]. También se detectó H_2 *in situ* en las aguas subterráneas que percolaban en los basaltos.

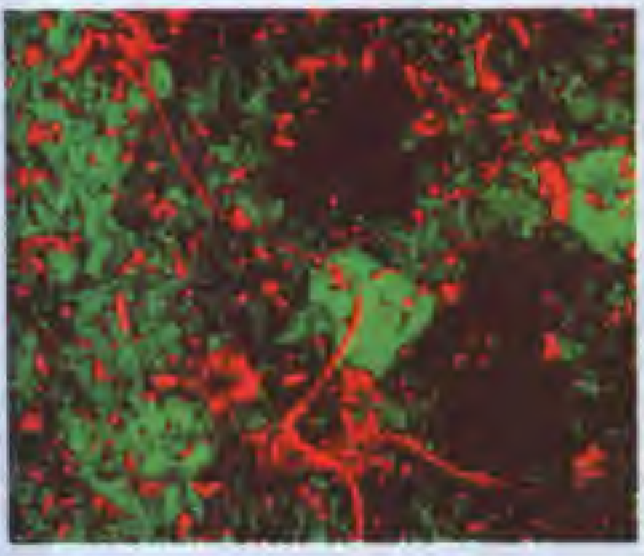
El análisis de los resultados experimentales hizo suponer que el H_2 que se forma en las profundidades de la Tierra es el donador de electrones que soporta el crecimiento de las considerables poblaciones de procariotas anaeróbicos que se han encontrado allí. Si esto es cierto, dichos organismos tendrían una existencia estrictamente geoquímica, dado que tanto su aceptor de electrones (CO_2 en el caso de los metanógenos y homoacetógenos, y SO_4^{2-} en el caso de los reductores de sulfato) como el donador de electrones (H_2) proceden de materiales inorgánicos. Estos quimiolitotrofos subterráneos representan una gran novedad, debido a su total independencia de la producción primaria fotosintética, que genera el oxígeno molecular y/o la materia orgánica y es necesaria para prácticamente todos los organismos que habitan en la superficie. Sin embargo, como ocurre a veces en la investigación, otros descubrimientos han puesto en duda esa interpretación. Aunque esos basaltos no tienen mucha materia orgánica, alguna hay, por lo que la fermentación podría ser la fuente de parte (o incluso de la mayoría) del H_2 usado por los diversos quimiolitotrofos de H_2 en la subsuperficie[2].

Es evidente que queda mucho por investigar sobre la extensión y el significado ecológico de los ecosistemas microbianos profundos basados en el H_2, independientemente del origen de este elemento. Pero está claro que en la subsuperficie profunda habitan microorganismos metabólicamente activos que consumen H_2, y que este hecho sugiere a su vez que pueden ser agentes biogeoquímicos importantes en esos ambientes. ■

---

[1] Stevens, T. O. y J. P. McKinley. 1995. Lithoautotrophic microbial ecosystems in deep basalt aquifers. *Science* 270:450-454.

[2] Anderson, R. T., F. H. Chapelle, y R. D. Lovely. 1998. Evidence against hydrogen-based microbial ecosystem in basalt aquifers. Science 281:976-977.



(*a*)

Figura 1 (a) Micrografía láser confocal de un biofilme microbiano adherido a la superficie de una lasca de basalto. El color verde es la luz reflejada por la superficie del basalto, mientras que el color rojo procede de las células bacterianas teñidas con rojo Nilo. Las células de este biofilme crecieron a partir del H_2 del basalto, como se indica en la reacción de la Figura 1*b*. (b) Reacciones metabólicas clave en procariotas anaerobios creciendo en acuíferos profundos anóxicos de basalto.

Metanogénesis: $4\ H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2\ H_2O$

Acetogénesis: $4\ H_2 + 2\ HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_3COO^- + 4\ H_2O$

Reducción de sulfato: $4\ H_2 + SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow HS^- + 4\ H_2O$

Producción inorgánica de H_2 propuesta: $FeO + H_2O \rightarrow H_2 + FeO_2$

(*b*)

19.5 Ambientes de agua dulce

Los ambientes acuáticos típicos son los lagos, estanques, ríos y manantiales. Los ambientes acuáticos difieren considerablemente de cualquier otro en sus propiedades fisicoquímicas y no es sorprendente que también sea distinta la composición de especies microbianas que viven en ellos. Los organismos fototróficos predominantes en la mayoría de los ambientes acuáticos son microorganismos. En las zonas óxicas, cianobacterias y algas son los más abundantes; en las zonas anóxicas dominan las bacterias fototróficas anoxigénicas. Las algas que flotan o se mantienen en suspensión se denominan **fitoplancton**; las que se adhieren al fondo o a los lados, **algas bénticas**. Dado que estos organismos fototróficos utilizan energía que obtienen de la luz para la producción inicial de materia orgánica, también se llaman **productores primarios**.

En el análisis final, la actividad microbiológica de un ecosistema acuático depende de la tasa de producción primaria que llevan a cabo los organismos fototróficos. Los fototrofos oxigénicos producen nuevo material orgánico, así como oxígeno. Cuando la actividad fotosintética es muy elevada, la materia orgánica lleva al agotamiento de O_2 y a condiciones anóxicas. Este hecho desencadena a su vez formas alternativas de metabolismo, en particular la fermentación y la respiración anaeróbica (*véanse* Secciones 17.13-17.21).

Relaciones con el oxígeno en lagos y ríos

Los requerimientos de oxígeno y la anaerobiosis han sido estudiados en la Sección 6.13; la producción de oxígeno mediante la fotosíntesis, en la Sección 17.5; y el papel del oxígeno en los microambientes, en la Sección 19.2. Aunque el oxígeno es uno de los gases más abundantes en la atmósfera (~ 21% del aire), su solubilidad en el agua es limitada, y el intercambio entre el oxígeno disuelto y el oxígeno atmosférico en las grandes masas de agua es lento. La producción fotosintética significativa de oxígeno en mares y lagos se lleva a cabo sólo en las *capas superficiales*, donde hay luz disponible (*véase* Figura 19.1). La materia orgánica que no se consume en estos estratos superiores va a parar al fondo, donde se descompone por la acción de microorganismos facultativos, que utilizan el oxígeno disuelto en el agua. En los lagos, cuando se ha consumido el oxígeno disuelto, las capas más profundas se vuelven anóxicas; en esa zona no pueden crecer organismos aeróbicos estrictos, como plantas superiores y animales, y su composición en especies está restringida a bacterias anaeróbicas y algunos animales microaerofílicos. Además, se produce un cambio del metabolismo respiratorio al fermentativo y al metanogénico, con importantes repercusiones en el ciclo del carbono y de otros nutrientes (para un tratamiento más extenso, *véanse* Secciones 19.9-19.11).

El que una masa de agua quede desprovista o no de oxígeno depende de varios factores. Si la materia orgánica es escasa, como ocurre en lagos con poca producción o en mar abierto, es posible que no haya suficiente sustrato disponible para que los quimioorganotrofos consuman todo el oxígeno. También es importante la velocidad de intercambio de agua entre las capas profundas y la superficie. En las zonas con fuertes corrientes o turbulencias, las masas de agua se mezclan bien, por lo que el oxígeno puede alcanzar las zonas profundas. Sin embargo, en muchos lagos de climas templados, la masa de agua permanece *estratificada* durante el verano, con unas capas superiores menos densas y con mayor temperatura, las cuales constituyen el *epilimnion*, separadas de las capas inferiores, más frías y densas (el *hipolimnion*) (Figura 19.9). Cuando se produce la estratificación, normalmente a principios de verano, las capas inferiores se vuelven anóxicas (*véase* Figura 19.9). A final del otoño o a principios del invierno, las aguas superficiales se enfrían y, por tanto, se vuelven más densas que las capas inferiores, produciéndose un intercambio que causa la aireación del fondo. Por todo ello, la mayoría de los lagos de zonas templadas muestran un ciclo anual en el que las capas inferiores pasan de óxicas a anóxicas y de nuevo a óxicas. Los cambios en el contenido de oxígeno alteran la actividad microbiana, aunque ésta también está fuertemente influida por otros factores, especialmente la temperatura.

Ríos

El oxígeno es un factor de particular interés, especialmente en los ríos que reciben mucha materia orgánica procedente de aguas residuales y de contaminación industrial. Aunque las aguas de un río se mezclen mucho debido al flujo del agua y a turbulencias, si el aporte de materia orgánica es muy elevado puede producirse un déficit de oxígeno debido a la respiración bacteriana, como se ilustra en la Figura 19.10. A medida que el agua se aleja del lugar donde se produce la descarga de residuos, la materia orgánica es consumida gradualmente y la concentración de oxígeno

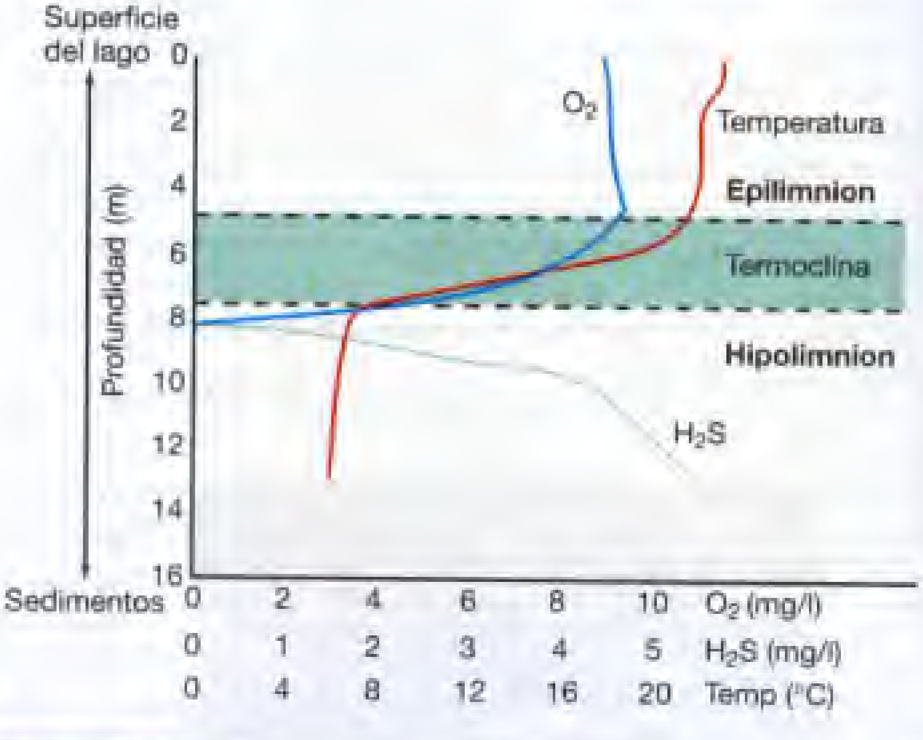
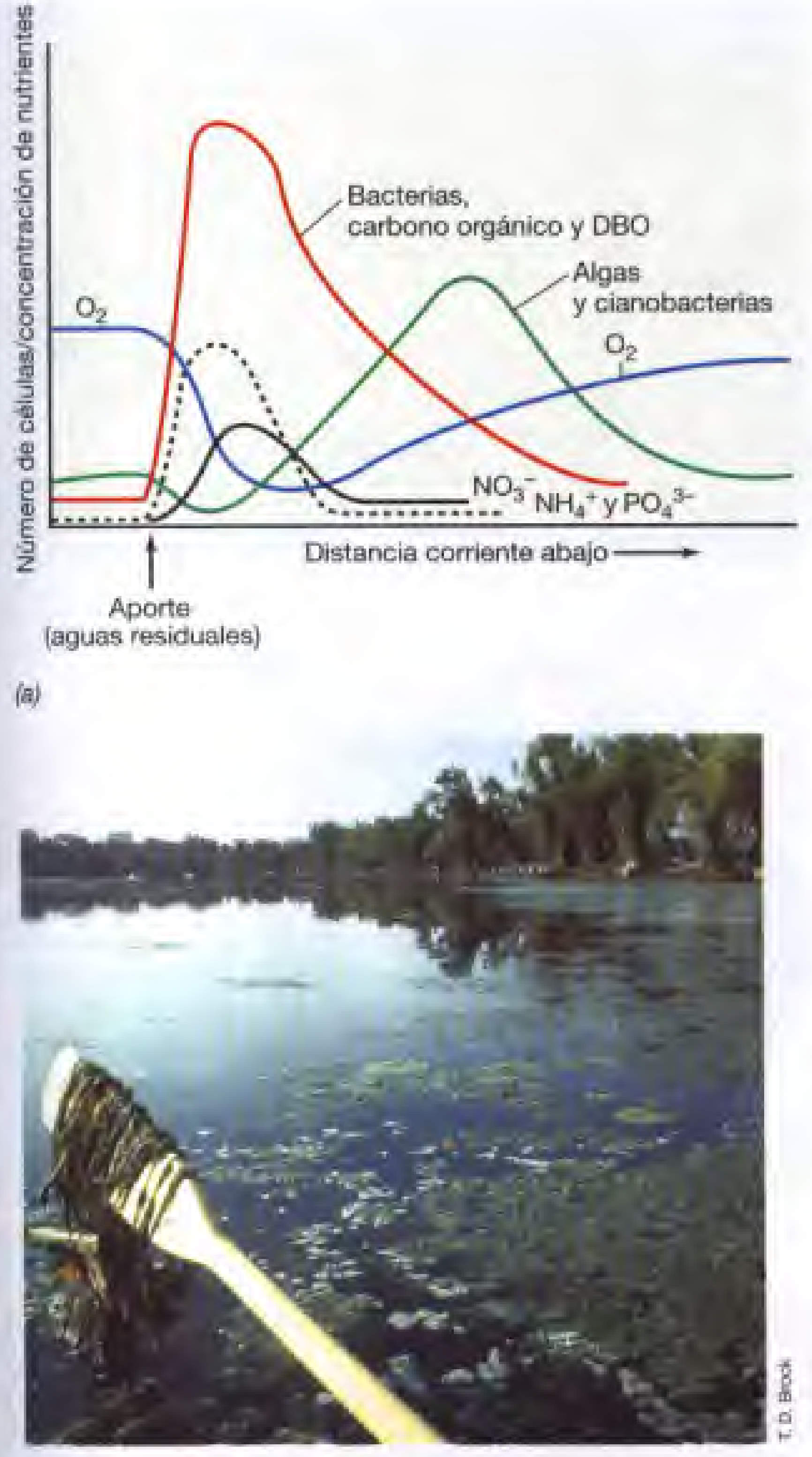


Figura 19.9 Desarrollo de condiciones anóxicas en las profundidades de un lago de clima templado, como resultado de la estratificación estival. Las aguas más frías del fondo son más densas y contienen H_2S procedente de la reducción bacteriana del sulfato. La zona que presenta un cambio rápido de temperatura se denomina *termoclina*. A medida que las aguas superficiales se enfrían en otoño y en invierno, suelen alcanzar la temperatura y la densidad propias de las aguas hipolimnéticas y, al hundirse, desplazan a las del fondo, dando lugar a la «mezcla del lago».



T. D. Brock

Figura 19.10 Efecto de la incorporación de aguas residuales o de otros desechos ricos en materia orgánica a los sistemas acuáticos. (a) En un río, la respuesta inmediata a una descarga de materia orgánica es el aumento del número de bacterias heterotróficas y la disminución de los niveles de O_2. Si el aporte contiene NH_4^+, por ejemplo, de aguas residuales, el amonio es oxidado a NO_3^- por las bacterias nitrificantes (véanse Secciones 12.3, 17.12 y 19.12). Nótese que el aumento de NH_4^+ va seguido poco después del aumento de NO_3^-, al irse produciendo las dos etapas del proceso de la nitrificación. El incremento del número de algas y cianobacterias es, ante todo, una respuesta a los nutrientes inorgánicos, especialmente PO_4^{3-}. En cuanto se ha consumido la mayor parte de los compuestos orgánicos oxidables y los inorgánicos, el O_2 vuelve a los niveles previos a la entrada de aguas residuales. (b) Un lago eutrófico (rico en nutrientes), Lago Mendota, Madison (Wisconsin), abundante en algas, cianobacterias y macrófitos (plantas acuáticas). Estos organismos crecen como respuesta a la contaminación por nutrientes inorgánicos, que en su mayor parte son resultado de la escorrentía producida por la actividad agraria en la cuenca del lago. Las plantas muertas y las algas tienen tanta demanda biológica de oxigeno (DBO), que aunque estos fototrofos aportan oxigeno mediante la fotosíntesis, su degradación determina un agotamiento del O_2 a gran escala.

se acerca a la normalidad. La disminución de la concentración de oxígeno en una masa de agua no es conveniente porque en condiciones anóxicas, aunque sean sólo temporales, los animales se mueren. Además, cuando el agua se vuelve anóxica, empiezan a crecer bacterias anaeróbicas que producen compuestos con un fuerte olor (por ejemplo, aminas, H_2S, mercaptanos o ácidos grasos), algunos de los cuales también son tóxicos para los organismos superiores.

Demanda biológica de oxígeno

La capacidad de consumir oxígeno que tiene una masa de agua determinada se conoce como **demanda biológica de oxígeno (DBO)**. Para determinar la DBO se toma una muestra de agua, se airea bien y se coloca en una botella que se precinta y se pone en incubación durante un periodo estándar de tiempo (normalmente 5 días a 20°C). Al final del periodo de incubación, se determina el oxígeno residual que contiene el agua. La DBO es una medida indirecta de la cantidad de materia orgánica del agua que puede ser oxidada por los microorganismos. Cuando un río se recupera de la contaminación producida por compuestos orgánicos, el descenso de la DBO se acompaña de un aumento en la concentración del oxígeno disuelto (Figura 19.10*a*).

Vemos, por tanto, que en una masa de agua los ciclos del carbono y del oxígeno estan interrelacionados, y la concentración de cada uno de estos elementos suele ser inversamente proporcional a la del otro. Esto se hace especialmente evidente en los ambientes *anóxicos*, donde hay abundancia de carbono (*véase* Secciones 19.9-19.11).

✓ 19.5 Revisión de conceptos

En los ecosistemas acuáticos, los microorganismos fototróficos son generalmente los productores primarios. Las bacterias consumen la mayor parte de la materia orgánica que se produce, lo cual conduce al agotamiento del oxígeno en el medio. La DBO es una medida del consumo de oxígeno por microorganismos en la muestra de agua.

- ✓ ¿Qué es un *productor primario?*
- ✓ ¿Dónde se encuentra en un lago el *epilimnion* y el *hipolimnion*?
- ✓ Si se añade materia orgánica a una muestra de agua, ¿se produce un *aumento* o una *disminución* de la DBO?

III MICROBIOLOGÍA MARINA

Los océanos difieren en muchos aspectos de los ambientes de agua dulce, por ejemplo, en salinidad, temperatura media y estado nutricional. La aplicación a la ecología microbiana de técnicas moleculares, especialmente la tinción genética, así como el aislamiento y secuenciación de genes (*véanse* Secciones 18.4-18.6), está proporcionando nueva información sobre los microoganismos marinos. En este capítulo trataremos tres temas clave: la presencia de procariotas en mar abierto, la microbiología de las profundidades marinas y los extensos ecosistemas microbianos que sostienen vida animal en las proximidades de las fuentes hidrotermales marinas.

19.6 Ambientes marinos y distribución de microorganismos

Comparados con los ambientes de agua dulce típicos, los niveles nutritivos en el mar abierto con frecuencia resultan limitantes, especialmente en el caso del nitrógeno, el fósforo y el hierro, que son nutrientes inorgánicos clave. La actividad de los productores primarios (principalmente, la fijación fotosintética de CO_2) se ve constreñida por esas deficiencias en la nutrición, lo que provoca que el número de células en ese medio sea inferior al de los ecosistemas de agua dulce. Sin embargo, como los océanos son tan grandes, la fotosíntesis colectiva y la producción de oxígeno que tiene lugar en ellos son factores esenciales en el equilibrio ecológico del carbono en la Tierra y su influencia global abarca desde la cadena alimentaria marina hasta el clima del Planeta.

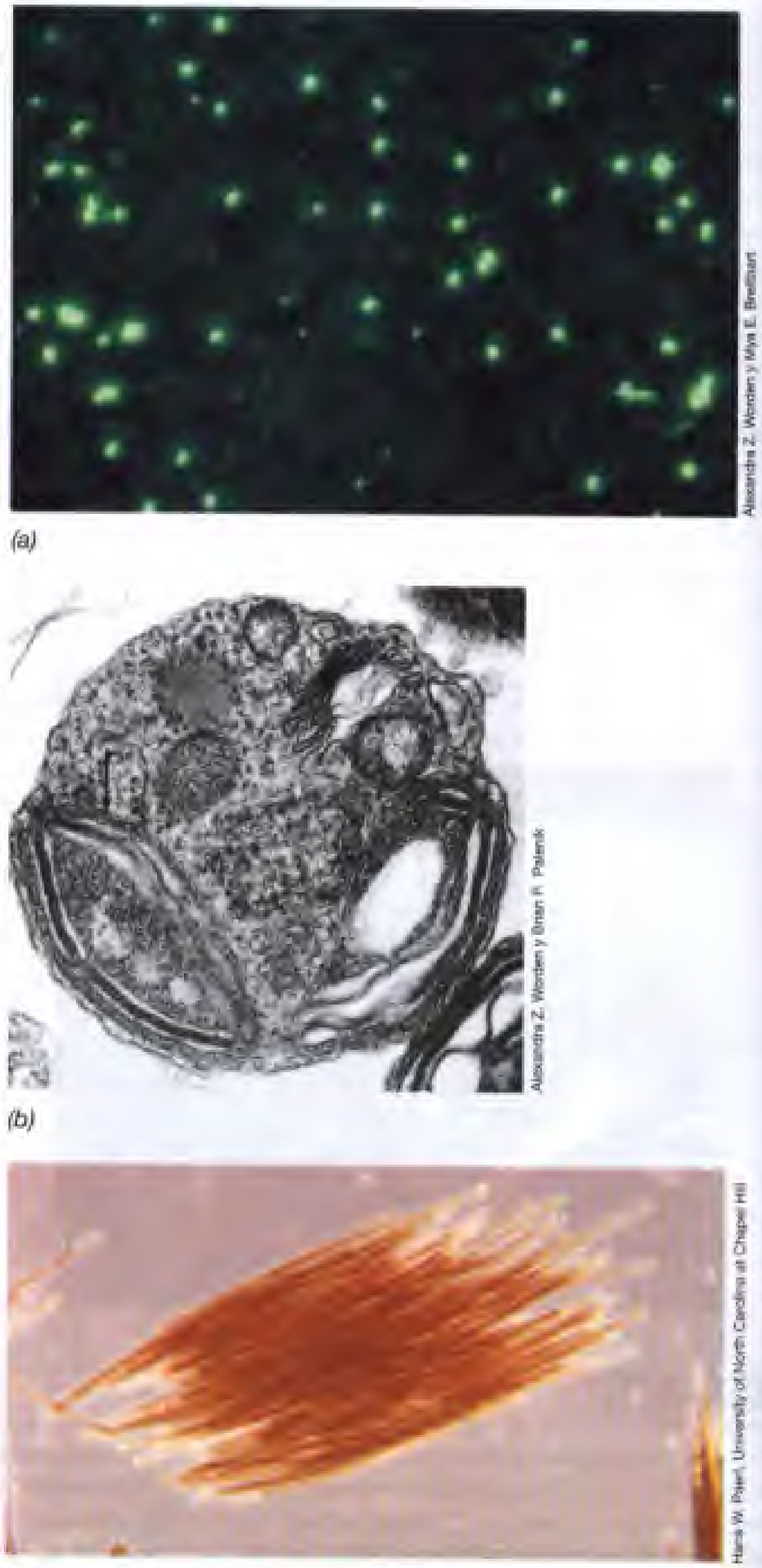
Producción primaria

Una parte importante de la producción primaria en mar abierto, incluso a profundidades significativas, se debe a la actividad fotosintética de los *proclorófitos*, diminutos procariotas que contienen clorofilas *a* y *b*; *Prochlorococcus* (organismo emparentado con las cianobacterias) es un destacado productor primario (*véanse* Figura 19.11*a* y Sección 12.27). En los mares tropicales y subtropicales, la cianobacteria planctónica filamentosa *Trichodesmium* (*véase* Figura 19.11*c*) es también abundante. Las células de *Trichodesmium* forman penachos de filamentos que constituyen una fracción significativa de la biomasa suspendida en esas aguas. La producción de nitrógeno fijado por *Trichodesmium* es muy importante en el ciclo del nitrógeno (*véase* Sección 19.12) en ambientes marinos. En aguas costeras, se han encontrado, incluso, cantidades muy pequeñas de *eucariotas* fototrofos, algunos de los cuales están entre las células eucariotas de menor tamaño que se conocen. *Ostreococcus*, por ejemplo, es un alga extremadamente pequeña, de unos 0,7 mm de diámetro (Figura 19.11*b*), menor que una célula de *Escherichia coli*.

La zona próxima a la orilla suele ser más fértil desde el punto de vista de los nutrientes que las aguas de mar abierto y, en consecuencia, mantienen poblaciones más densas de microorganismos fototróficos (Figura 19.12). Esto, a su vez, alimenta densidades más elevadas de bacterias quimiotróficas y de animales acuáticos, como peces, moluscos, crustáceos, etc. Las bahías y masas interiores que reciben niveles altos de nutrientes de los residuos industriales tienen grandes cantidades de fitoplancton y bacterias. Si la contaminación es suficientemente alta, las aguas marinas someras se pueden volver anóxicas, una vez que las bacterias agotan el O_2, y tóxicas para la vida marina por la producción de H_2S por las bacterias sulfato reductoras que se desarrollan rápidamente en las zonas anóxicas (*véase* Sección 19.13).

Microbiología del mar abierto

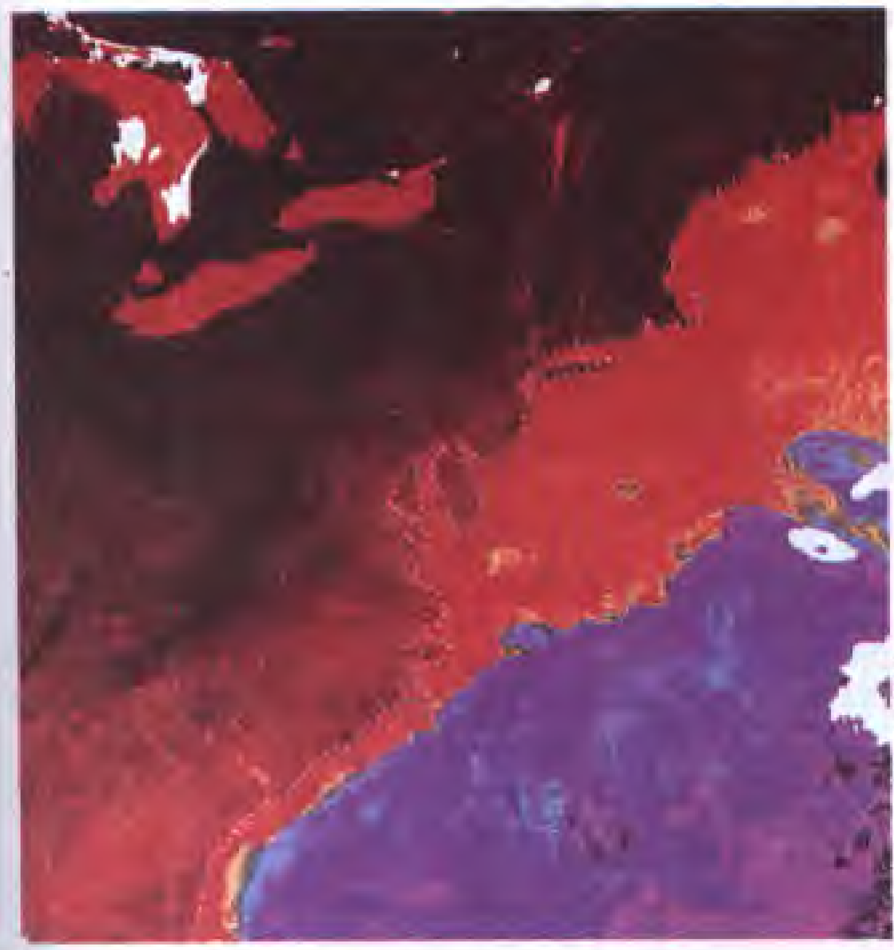
A pesar de los bajos niveles de nutrientes inorgánicos y de carbono orgánico, en el mar abierto se han encontrado números significativos en suspensión, entre 10^5 y 10^6 células procarióticas por mililitro. Además, hay células eucariotas muy pequeñas presentes en números estimados por encima


(a) Alexandra Z. Worden y Mya E. Breitbart

(b) Alexandra Z. Worden y Brian F. Palenik

(c) Hans W. Paerl, University of North Carolina at Chapel Hill

Figura 19.11 Fototrofos marinos oxigénicos. (a) Tinción filogénetica FISH (*véase* Sección 18.4) de células del proclorófito *Prochlorococcus*, fototrofo dominante en aguas marinas subtropicales. (b) Micrografía electrónica de transmisión de una célula de *Ostreococcus*, una diminuta alga (eucariota), que se ha encontrado en grandes números en aguas costeras. La flecha señala el cloroplasto. Las células de *Prochlorococcus* y las de *Ostreococcus* miden unos 0,7 µm de diámetro. (c) *Trichodesmium*, cianobacteria fijadora de nitrógeno. Las células forman penachos que fijan activamente N_2 en aguas de todos los mares tropicales. Un filamento de *Trichodesmium* mide unos 6 mm de diámetro. Para una mayor información sobre proclorofitos, algas y cianobacterias se recomienda consultar las Secciones 12.26, 14.11 y 12.25, respectivamente.



Otis Brown y Robert Evans, NASA

Figura 19.12 Distribución de la clorofila en el Atlántico Norte occidental fotografiada por satélite. Se aprecia la costa este de Estados Unidos, desde la mitad de Florida hasta el norte de Maine (línea de puntos). Hacia el centro de la foto se halla la bahía de Chesapeake; los Grandes Lagos se ven en la parte superior izquierda. Las áreas ricas en fitoplancton se muestran en color rojo (> 1 mg clorofila/m^3); las áreas azules y violetas presentan menores concentraciones de clorofila (< 0,01 mg/m^3). Obsérvese la elevada productividad primaria en las áreas costeras y en los Grandes Lagos.

de 10^4 eucariotas por mililitro. ¿De qué viven estos organismos? Los resultados obtenidos apuntan a un metabolismo energético basado en la luz como elemento clave en el mantenimiento de esta microbiota de mar abierto. Ya se han comentado algunos de estos organismos, como *Prochlorococcus*, *Trichodesmium* y los diminutos eucariotas fototrofos (*véase* Figura 19.11). Otros fototrofos llevan a cabo fotosíntesis *anoxigénica* (*véanse* Secciones 12.2 y 17.4). Estos organismos pueden estar relacionados con las bacterias fototróficas «aerobias» que se han aislado de aguas marinas próximas a la orilla (*véase* Sección 12.2).

Pero, además de estos fototrofos, la mayor sorpresa ha sido el descubrimiento de que muchas bacterias en la zona fótica del mar (hasta 300 metros) contienen una forma del pigmento visual, rodopsina, y son capaces de usarlo para convertir la energía luminosa en ATP. En la Sección 13.3 se ha comentado el caso bien estudiado de la *bacteriorrodopsina*, presente en la arquea halófila *Halobacterium*, y cómo esta molécula participa en la síntesis de ATP. La forma de rodopsina que se encuentra en los procariotas de mar abierto es muy parecida a la bacteriorrodopsina, pero está presente en células que filogenéticamente corresponden al dominio *Bacteria*, no *Archaea*. Recibe el nombre de **proteorrodopsina** porque los organismos que la contienen son proteobacterias (*véase* Sección 12.1). Se cree que esta molécula es la base del metabolismo energético de estas bacterias marinas, las cuales dejan de depender del carbono orgánico como fuente de energía. Es así como los mecanismos de síntesis de ATP originados por la luz, ya sea la fotosíntesis en el sentido clásico o cualquier otro, parecen estar ampliamente distribuidos en los procariotas presentes en las aguas de las capas superiores de los océanos.

Distribución *Archaea/Bacteria*

El número de procariotas en mar abierto disminuye con la profundidad. En la superficie el promedio se sitúa entre 10^5-10^6 células/ml. Sin embargo, por debajo de los 1000 metros el número total desciende a 10^3-10^5 células/ml. El uso de tinciones filogenéticas para diferenciar células de cada dominio filogenético (*véase* Sección 18.4) ha revelado una interesante distribución de *Bacteria* y *Archaea* en relación con la profundidad en mar abierto. En general, las especies de *Bacteria* predominan en las aguas superiores (< 1000 metros), mientras que los números son iguales o muestran un ligero predominio de *Archaea* en las aguas profundas (Figura 19.13). Las *Archaea* presentes en aguas más bajas son casi exclusivamente especies de crenoarqueotas, un filum de *Archaea* que incluye las hipertermófilas (*véanse* Secciones 13.8-13.10). Extrapolando los datos de la Figura 19.13, se ha

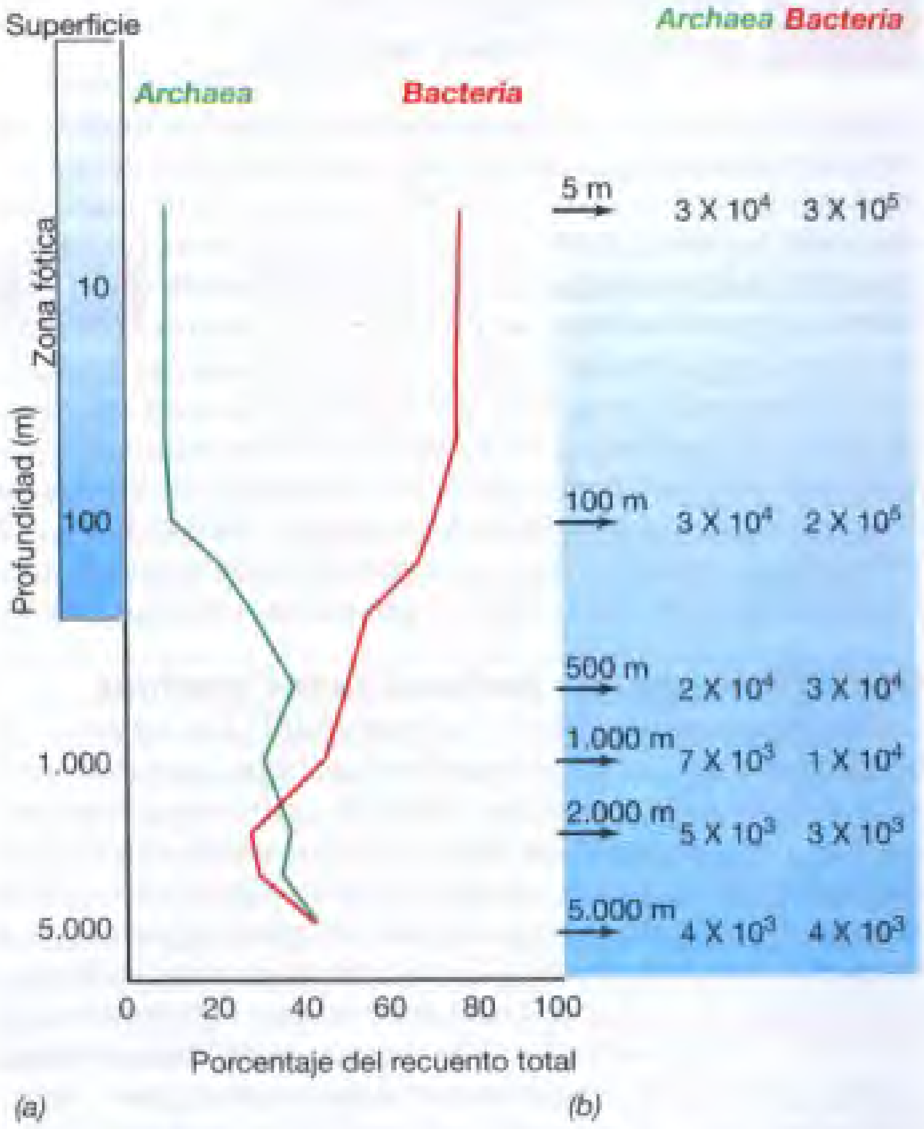


Figura 19.13 Porcentaje total de procariotas pertenecientes al dominio *Archaea* o al dominio *Bacteria* en las aguas del Pacífico Norte. (a) Distribución de *Archaea* y *Bacteria* según la profundidad. (b) Números absolutos de *Archaea* y *Bacteria* (por mililitro). Adaptado de *Nature* 409:507-510 (2000).

estimado que en el conjunto de los océanos de todo el mundo existen 1,3 × 10^{28} y 3,1 × 10^{28} células de *Archaea* y *Bacteria*, respectivamente. Esto indica que los océanos contienen la mayor cantidad de biomasa microbiana que existe en toda la superficie de la Tierra (*véase* Sección 1.3).

✓ 19.6 Revisión de conceptos

Aunque el agua marina es nutricionalmente más pobre que algunas masas de agua dulce, alberga un significativo número de microorganismos. Muchos de ellos dependen del metabolismo fototrófico de una u otra clase. En relación con los procariotas, las especies del dominio *Bacteria* suelen predominar en las aguas superficiales, en tanto que las *Archaea* prevalecen en aguas más profundas.

- ✓ ¿Cómo participa *Prochlorococcus* en el ciclo del carbono y del oxígeno en los mares?
- ✓ ¿Qué es la proteorrodopsina y a qué debe este nombre? ¿Cómo ha ayudado la proteorrodopsina a solucionar el misterio de que grandes números de células bacterianas puedan coexistir en aguas de mar abierto, esencialmente desprovistas de materia orgánica?
- ✓ ¿Cómo se distribuyen diferencialmente las *Archaea* y *Bacteria* en los océanos?

19.7 Microbiología de las profundidades marinas

¿Cómo son las profundidades marinas y qué fenómenos de interés microbiológico tienen lugar allí? La luz solar penetra hasta un máximo de unos 300 metros en el mar abierto; esa parte superior iluminada se denomina **zona fótica** (Figura 19.13). Por debajo, aproximadamente hasta unos 1000 metros de profundidad, se produce una intensa actividad biológica como resultado de la acción de animales y microorganismos quimioorganotrofos. Comparadas con esa zona, las aguas de profundidades superiores son relativamente inactivas desde el punto de vista biológico. Al referirse a ellas se habla de «profundidades marinas». Más del 75% del volumen de agua del mar corresponde a las grandes profundidades, entre 1000 y 6000 m por debajo de la superficie.

Condiciones en las profundidades marinas

Los organismos que habitan las profundidades deben estar adaptados a tres condiciones extremas: bajas temperaturas, altas presiones y concentraciones de nutrientes muy pequeñas. Por debajo de los 100 m, el agua marina se halla a una temperatura prácticamente constante de 2 o 3°C. En la Sección 6.8, se trató la respuesta de los microorganismos a los cambios de temperatura. Como cabría esperar, las bacterias aisladas de profundidades superiores a 100 metros son *psicrófilas* (amantes del frío). Algunas son psicrófilas *extremas*, y sólo crecen a temperaturas que difieran muy poco de su hábitat natural. Los microorganismos de las profundidades marinas deben también ser capaces de resistir las enormes presiones hidrostáticas asociadas a estas profundidades. La presión aumenta *1 atmosfera (atm)* cada *10 m* de profundidad. Esto significa que un organismo que viva a 5000 m de profundidad deberá soportar presiones de 500 atm.

Bacterias barotolerantes y barofílicas

Podemos preguntarnos si las bacterias de las profundidades simplemente *toleran* las altas presiones (en cuyo caso serían *barotolerantes*) o dependen realmente de esa presión elevada (en cuyo caso serían *barofílicas*). Los estudios con bacterias de las profundidades han demostrado que los dos modelos son posibles y que la distribución de las bacterias barotolerantes y las barofílicas dependen básicamente de la profundidad. Los organismos aislados a profundidades de alrededor de 3000 m y utilizados en estudios que relacionan el crecimiento o la actividad metabólica con la presión, demuestran que son **barotolerantes**; su tasa metabólica es más elevada si se cultivan a 1 atm que a 300 atm, pero la velocidad de crecimiento suele ser la misma para ambas presiones (Figura 19.14). Sin embargo, las bacterias barotolerantes aisladas no crecen a presiones superiores a 500 atm. Por el contrario, los cultivos de muestras de profundidades mayores, entre 4000 y 6000 m, son **barofílicos**; presentan un crecimiento óptimo a unas 400 atm (*véase* Figura 19.14). Debe notarse que, aunque los barófilos crecen mejor bajo presión, conservan la capacidad de crecer a 1 atm (Figura 19.14).

De muestras de profundidades aún mayores (10 000 m), se han obtenido **barófilos extremos (estrictos)**. En una cepa estudiada detalladamente se observó un crecimiento máximo a una presión de 700-800 atm, y podía crecer hasta una presión de 1035 atm, que es la que soporta en su hábitat natural (*véase* Figura 19.15). Un aspecto singular de este barófilo extremo era que no solamente *toleraba* una presión elevada, sino que la *necesitaba* para poder crecer; no se observó crecimiento a presiones inferiores a 400 atm (Figura 19.14). Sin embargo, resulta interesante que este barófilo extremo podía resistir periodos moderados de descompresión sin verse afectado, aunque dejaba de ser viable si permanecía en estado de descompresión durante varias horas.

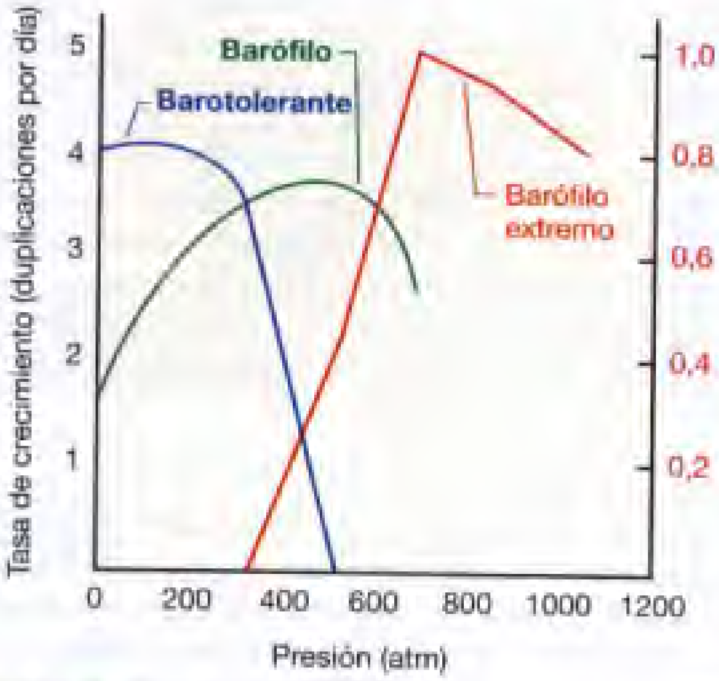
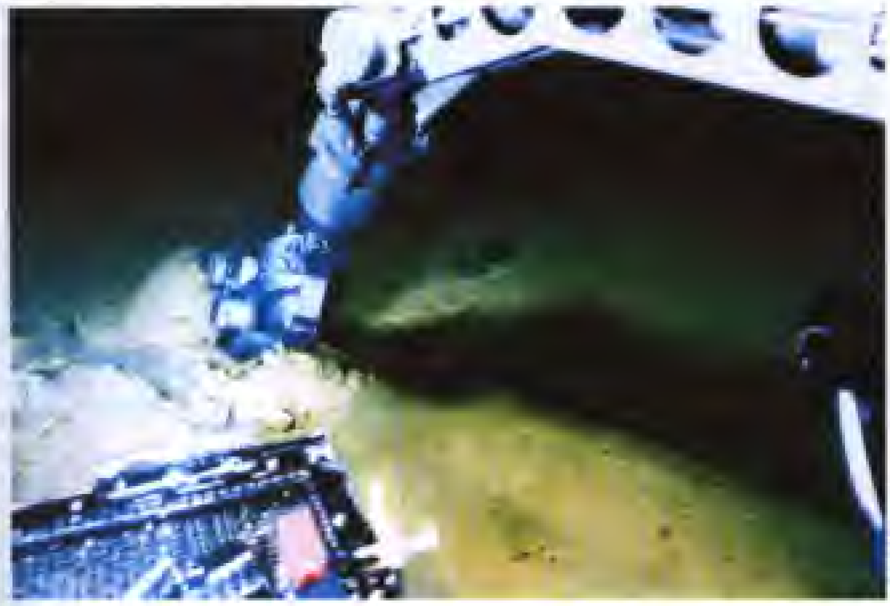


Figura 19.14 Crecimiento de las bacterias barotolerantes, barofílicas y barofílicas extremas. Estas últimas se aislaron de la Fosa de las Marianas (*véase* Figura 19.15). Obsérvese la velocidad de crecimiento mucho menor (a cualquier presión) de los barófilos extremos (en la ordenada de la derecha), en comparación con los barotolerantes y los barófilos (en la ordenada de la izquierda). Obsérvese también la incapacidad de los barófilos extremos para crecer a bajas presiones.



Hideto Takami

Figura 19.15 Brazo de muestreo del sumergible *Kaiko* insertando un tubo en el sedimento del fondo marino en la Fosa de las Marianas (Océano Pacífico, frente a las Filipinas) a una profundidad de 10.897 metros. Los tubos de sedimento se recuperan y se utilizan para el enriquecimiento y aislamiento de las bacterias barófilas.

Las bacterias barotolerantes y barofílicas suelen preferir las temperaturas bajas, es decir, son psicrófilos. Esta propiedad es más dominante en los barófilos extremos. El barófilo extremo descrito en la Figura 19.14 era sensible a la temperatura; su temperatura óptima de crecimiento era la ambiental de 2°C, y por encima de los 10°C, su viabilidad disminuía de manera significativa.

Efectos moleculares de las altas presiones

Se sabe que la presión afecta a la fisiología y a la bioquímica de la célula. Se ha demostrado que el aumento de la presión disminuye la capacidad de fijación de las enzimas a sus sustratos. Por tanto, las enzimas de los barófilos extremos deben estar plegadas de manera que el efecto causado por las altas presiones sea mínimo. La síntesis de proteínas y algunos fenómenos de membrana, como el transporte, son también blancos potenciales del efecto de las altas presiones. Un organismo que crezca a presión elevada tiene una mayor proporción de ácidos grasos insaturados en la membrana citoplasmática. Este cambio puede que responda a algún mecanismo adaptativo, porque hace que la membrana sea menos sensible a la gelificación a altas presiones. Las lentas velocidades de crecimiento de los barófilos extremos (*véase* Figura 19.14) se deben probablemente a una combinación de los efectos de la presión sobre la bioquímica celular con el hecho de que estos organismos sólo crecen a bajas temperaturas, lo que de todas maneras reduce mucho la velocidad de las reacciones químicas.

La utilización de las herramientas de la genética molecular ha aportado una nueva visión de la fisiología de la barofilia. En los barófilos Gram negativos capaces de crecer hasta 500-600 atm, se ha demostrado que el crecimiento a alta presión se acompaña de cambios en la composición de las proteínas de la membrana externa de la pared celular. En un barófilo estudiado en detalle se ha visto que una proteína de la membrana exterior llamada OmpH («*o*uter *m*embrane *p*rotein *H*», proteína H de la membrana externa) se sintetiza cuando las células crecen sometidas a altas presiones, pero no lo hace si el crecimiento tiene lugar a 1 atm. La OmpH es un tipo de *porina*, una proteína estructural que forma canales para la difusión de moléculas orgánicas a través de la membrana externa de la pared hacia el periplasma (*véanse* Sección 4.9 y Figura 4.36*b*). Según parece, la porina presente en las células del organismo barofílico que crece a bajas presiones no funciona adecuadamente a altas presiones, y debe sintetizarse otro tipo de molécula de porina.

El estudio de la OmpH demuestra que la presión puede afectar a la expresión génica en las bacterias barofílicas. No se sabe aún de qué manera sucede esto, pero podría deberse a la actividad de las proteínas represoras sensibles a la presión o a los activadores de genes dependientes de la presión (*véase* Capítulo 8). Sin embargo, parece que son relativamente pocas las proteínas controladas por la presión en las bacterias barofílicas, porque muchas de las proteínas se encuentran en las células tanto si se cultivan a alta presión como si crecen a bajas presiones. Las proteínas de la pared celular y las estructurales relacionadas con la pared celular, así como las de transporte, parecen ser los componentes con una mayor variabilidad.

✓ 19.7 Revisión de conceptos

La parte profunda del mar es un hábitat frío y oscuro, con una elevada presión hidrostática y baja disponibilidad de nutrientes. Los barófilos crecen mejor bajo condiciones de presión y los barófilos extremos, que se encuentran a las mayores profundidades, necesitan presiones elevadas para crecer.

✓ ¿Cómo cambia la presión con la profundidad?

✓ ¿Qué adaptaciones moleculares se producen en los barófilos que les permiten crecer óptimamente a grandes presiones?

19.8 Fuentes hidrotermales submarinas

La concepción general que se tiene de las profundidades marinas como un ambiente remoto, de bajas temperaturas y altas presiones, donde sólo pueden vivir bacterias barotolerantes y barofílicas de crecimiento lento es generalmente correcto, pero hay algunas excepciones sorprendentes. Distribuidas por todos los fondos marinos se encuentran comunidades muy activas de *animales* cuya subsistencia está asegurada por la actividad de microorganismos que se encuentran agrupados alrededor de fuentes hidrotermales que surgen en las grandes profundidades. Geológicamente, estos manantiales están asociados a *centros de expansión del fondo oceánico*, que son las zonas donde el basalto y el magma calientes hacen que el fondo se vaya separando lentamente. El agua marina que se filtra por las grietas en esas zonas se mezcla con minerales calientes y vuelve a salir a gran presión. Debido a sus características excepcionales, estas surgencias (Figura 19.16) se conocen como **fuentes hidrotermales submarinas** (*hidrothermal vents*).

Se conocen dos tipos principales: ***fuentes templadas*** (*warm vents*), que expulsan fluido hidrotermal a temperaturas de 6-23°C (en agua marina que está a 2°C); y ***fuentes calientes*** (*hot vents*), que desprenden el fluido a 270-380°C (*véase* Figura 19.16), y son conocidas también como ***chimeneas negras*** (*black smokers*), porque el agua, muy rica en minerales, forma una nube oscura de material precipitado al mezclarse

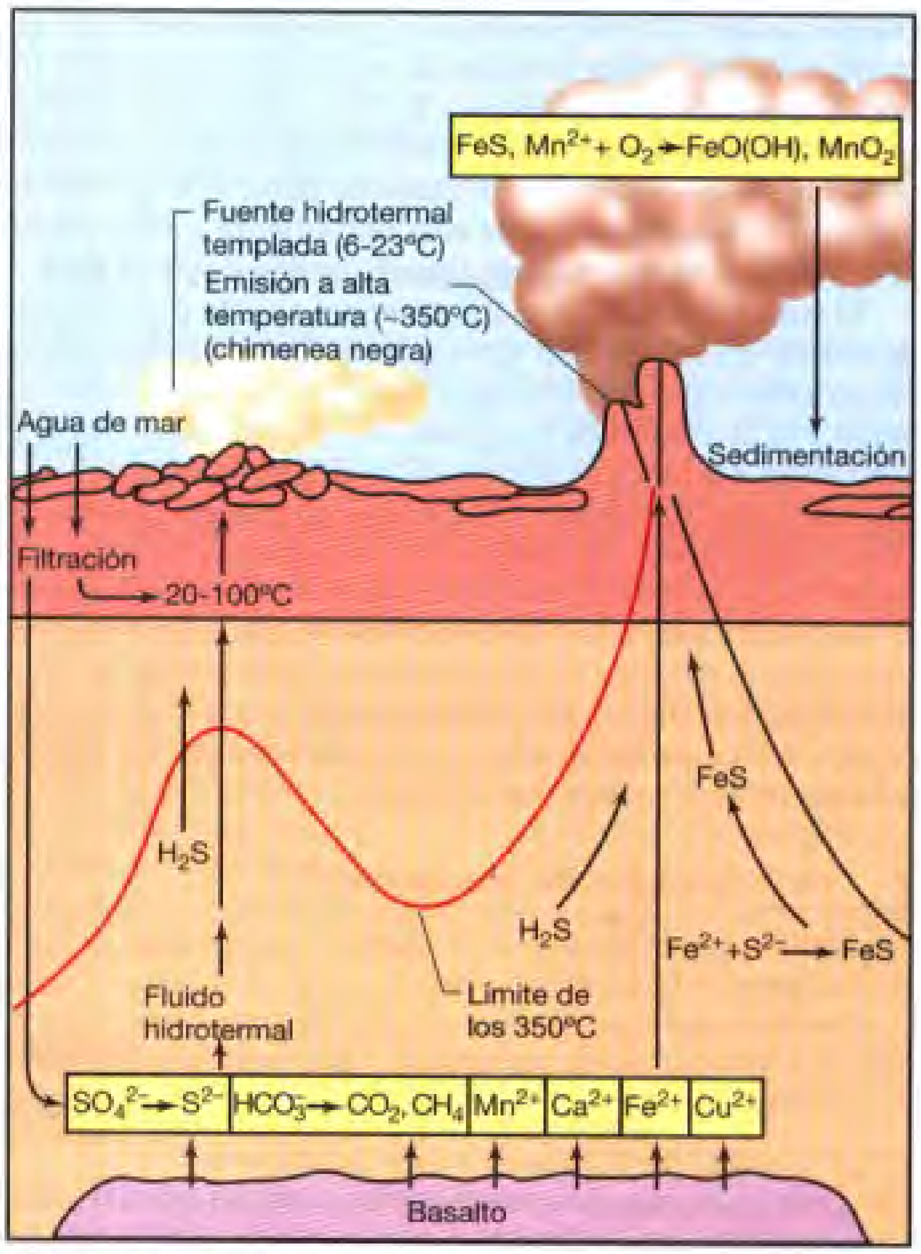

$FeS, Mn^{2+} + O_2 \rightarrow FeO(OH), MnO_2$
Fuente hidrotermal templada (6-23°C)
Emisión a alta temperatura (~350°C) (chimenea negra)
Agua de mar
Sedimentación
Filtración
20-100°C
H_2S
FeS
H_2S
$Fe^{2+} + S^{2-} \rightarrow FeS$
Fluido hidrotermal
Límite de los 350°C
$SO_4^{2-} \rightarrow S^{2-}$
$HCO_3^- \rightarrow CO_2, CH_4$
Mn^{2+}
Ca^{2+}
Fe^{2+}
Cu^{2+}
Basalto

Figura 19.16 Diagrama de las formaciones geológicas y de las principales especies químicas presentes en las fuentes hidrotermales templadas y en las chimeneas negras submarinas. En las fuentes hidrotermales, el fluido se enfría mediante el agua fría del mar (2-3°C) que se infiltra en los sedimentos. En las chimeneas negras, el fluido hidrotermal ascendente (próximo a los 350°C) llega al fondo del mar directamente. Las fuentes hidrotermales templadas y las chimeneas negras se encuentran generalmente a una profundidad de unos 2000 m, donde se puede acceder con submarinos pequeños especiales, como es el *Alvin*, utilizado por los investigadores del Woods Hole Oceanographic Institute (WHOI), en Woods Hole, MA.

con el agua marina. La velocidad de salida del agua en los dos tipos de fuentes también es característica: en las templadas el fluido sale a 0,5-2 cm/s, mientras que en las calientes lo hace a mucha mayor velocidad, 1-2 m/s.

Animales que viven en las fuentes hidrotermales submarinas

Con submarinos pequeños preparados para resistir altas presiones es posible estudiar los organismos asociados a las fuentes submarinas. Se han encontrado comunidades muy activas de invertebrados, que incluyen *gusanos tubícolas* (adscritos al grupo pogonóforos, o vestimentíferos), de más de 2 m de longitud, y un gran número de mejillones y almejas gigantes, de 20 y 25 cm, respectivamente (Figura 19.17). Si se tiene en cuenta que apenas existe productividad biológica en otros lugares de las grandes profundidades, cabe preguntarse: ¿cómo pueden existir unas comunidades

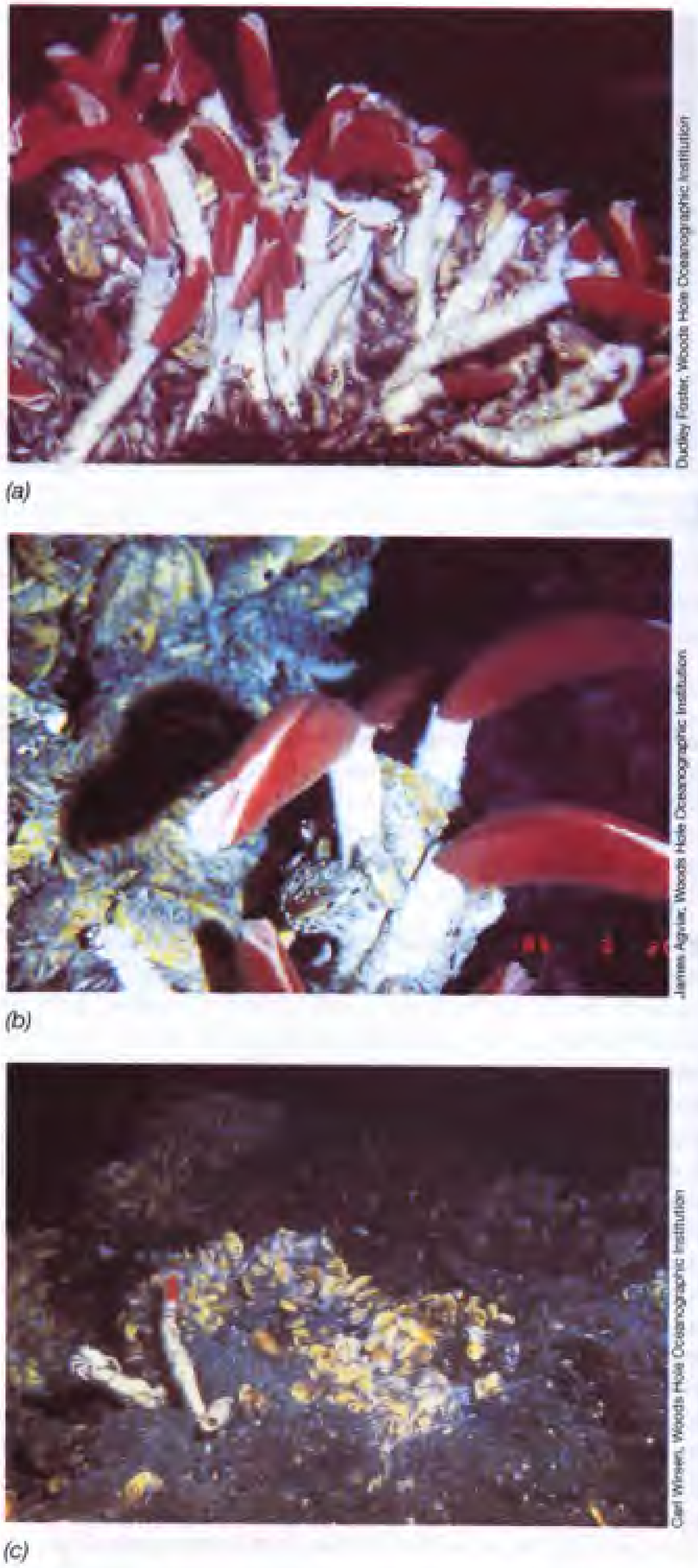

(a)
Dudley Foster, Woods Hole Oceanographic Institution
(b)
James Aguiar, Woods Hole Oceanographic Institution
(c)
Carl Wirsen, Woods Hole Oceanographic Institution

Figura 19.17 Invertebrados de hábitat cercanos a las fuentes hidrotermales submarinas. (a) El gusano tubícola (familia *Pogonophora*), mostrando la cutícula (blanca) y el penacho (rojo). (b) Fotografía más cercana mostrando el penacho del gusano. El penacho recoge los nutrientes de la fuente hidrotermal, especialmente el H_2S. Éste es transportado a las bacterias oxidadoras de sulfuro simbiontes que viven dentro del animal. *Véase* el texto para más detalles. (c) Banco de bivalvos junto a una fuente hidrotermal submarina caliente. Obsérvese la deposición amarilla de azufre elemental (resultado de la oxidación de H_2S por simbiontes quimiolitotróficos) en los bivalvos y alrededor de ellos.

tan densas de animales en ausencia de productores primarios fototróficos?, o, ¿de dónde se obtiene la energía?

El análisis químico del fluido hidrotermal demuestra la existencia de gran cantidad de materiales inorgánicos reducidos, incluyendo H_2S, Mn^{2+}, H_2 y CO. Algunas fuentes contienen poco H_2S, pero tienen una alta concentración de NH_4^+. No se ha encontrado materia orgánica en el fluido de ninguna de las surgencias estudiadas hasta ahora. El análisis de la química de estas surgencias y de los procesos microbianos asociados pone de manifiesto que los animales que viven allí dependen de la actividad de los quimiolitotrofos (*véanse* Secciones 17.8-17.12), que crecen a expensas de las fuentes de energía inorgánicas procedentes de las propias surgencias. El dióxido de carbono, que se encuentra en gran abundancia en el agua marina en forma de CO_3^{2-} y HCO_3^-, es fijado a carbono orgánico por los quimiolitotrofos, y éstos forman la base de una cadena de alimentación muy corta en la que se encuentran los animales que viven junto a las fuentes hidrotermales.

Microorganismos de las fuentes submarinas

En las fuentes hidrotermales, y en sus alrededores, viven grandes cantidades de quimiolitotrofos oxidadores de azufre, como *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Thiothrix* y *Beggiatoa* (*véanse* Secciones 12.4 y 17.10). A partir de muestras recogidas cerca de las fuentes termales, se han podido cultivar dichos organismos en el laboratorio y mediante experimentos *in situ* se ha demostrado la fijación de CO_2 y la oxidación de H_2S y $S_2O_3^{2-}$ por poblaciones naturales de dichas bacterias. Otras fuentes producen bacterias nitrificantes, oxidadoras de hidrógeno, oxidadoras de hierro y manganeso y metilotrofas. Estas últimas se nutren, probablemente, del metano y monóxido de carbono (CO) que desprenden las fuentes (para más información sobre algunos de estos grupos fisiológicos, *véanse* Capítulos 12 y 13). La Tabla 19.2 resume los donadores y aceptores de electrones dentro de los quimiolitotrofos que se supone que desempeñan una función en la ecología de las fuentes submarinas. Sin embargo, no se tienen pruebas de que los animales de esos hábitat se *coman* las bacterias quimiolitotrofas. Es la capacidad autotrófica de estos organismos la que proporciona el alimento a estos animales.

Nutrición de los animales que habitan junto a las fuentes submarinas

Determinados quimiolitotrofos viven en asociación directa con los animales de las fuentes submarinas. Los gusanos tubícolas de 2 m de longitud (*véase* Figura 19.17) carecen de boca, intestinos o ano, pero poseen un tubo digestivo modificado formado principalmente por un tejido esponjoso llamado **trofosoma**. El tejido del trofosoma, que constituye aproximadamente el 50% de su peso, contiene gránulos de azufre; la observación microscópica permite apreciar en el tejido del trofosoma gran cantidad de células procarióticas, unas 3,7 × 10^9 células/g (Figura 19.18). Las células esféricas grandes que se observan son estructuralmente similares a *Thiovulum*, una bacteria marina oxidadora de azufre. El tejido del trofosoma también muestra actividad de la enzima RubisCO y otras enzimas del *ciclo de Calvin*, la vía metabólica que utiliza la mayoría de los organismos autotrofos para convertir el CO_2 en material celular (*véase* Sección 17.6).

Las bacterias quimiolitotrofas alimentan al animal, ya que éste se nutre de los productos de excreción de los simbiontes y de sus células muertas. El pogonóforo *Riftia* (*véase* Figura 19.17*b*) posee abundantes vasos sanguíneos, que utiliza para atrapar O_2 y H_2S (*véase* más adelante), y transportarlos hasta los quimiolitotrofos en el trofosoma. Una conclusión similar se alcanza con relación a la nutrición de las almejas y mejillones gigantes (*véase* Figura 19.17*c*), presentes alrededor de las fuentes, ya que también se han encontrado comunidades de bacterias oxidadoras de sulfuro en las branquias de estos animales. Las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos (*véase* Capítulo 10) y los análisis filogenéticos (*véase* Capítulo 11) demuestran que todos los animales que viven en las fuentes submarinas albergan una bacteria simbionte principal, y que la especie de simbionte varía entre los diferentes grupos de animales.

Estudios más detallados de *Riftia* han puesto de manifiesto que estos animales contienen hemoglobinas poco frecuentes que captan H_2S además de O_2, y que transportan ambas moléculas hasta el trofosoma, donde quedan a disposición de las bacterias simbiontes; la captura del H_2S y su transporte hasta el lugar de utilización evitan la intoxicación del animal. El contenido de CO_2 en la sangre de *Riftia* también es elevado, de 20-30 mM, y se supone que se libera en el trofosoma como fuente de carbono para los simbiontes. Además, el análisis de isótopos estables (*véase* Sección 18.11) del azufre elemental hallado dentro de los simbiontes bacterianos muestra que la composición isotópica $^{34}S/^{32}S$ es la misma que la del sulfuro emitido desde la surgencia. Esta proporción es claramente diferente a la del sulfato del agua

TABLA 19.2 Procariotas quimiolitotróficos de importancia potencial en la producción primaria de las fuentes hidrotermales submarinas[a]

Quimiolitotrofos	Donador de electrones	Aceptor de electrones	Producto a partir del donador
Oxidadores del azufre	HS^-, S^0, $S_2O_3^{2-}$	O_2, NO_3^-	S^0, SO_4^-
Nitrificantes	NH_4^+, NO_2^-	O_2	NO_2^-, NO_3^-
Sulfato reductores	H_2	S^0, SO_4^{2-}	H_2S
Metanógenos	H_2	CO_2	CH_4
Oxidadores del hidrógeno	H_2	O_2, NO_3^-	H_2O
Oxidadores de hierro y manganeso	Fe^{2+}, Mn^{2+}	O_2	Fe^{3+}, Mn^{4+}
Metilotrofos	CH_4, CO	O_2	CO_2

[a] *Véanse* Secciones 17.8-17.12, donde se trata el metabolismo quimiolitotrófico.

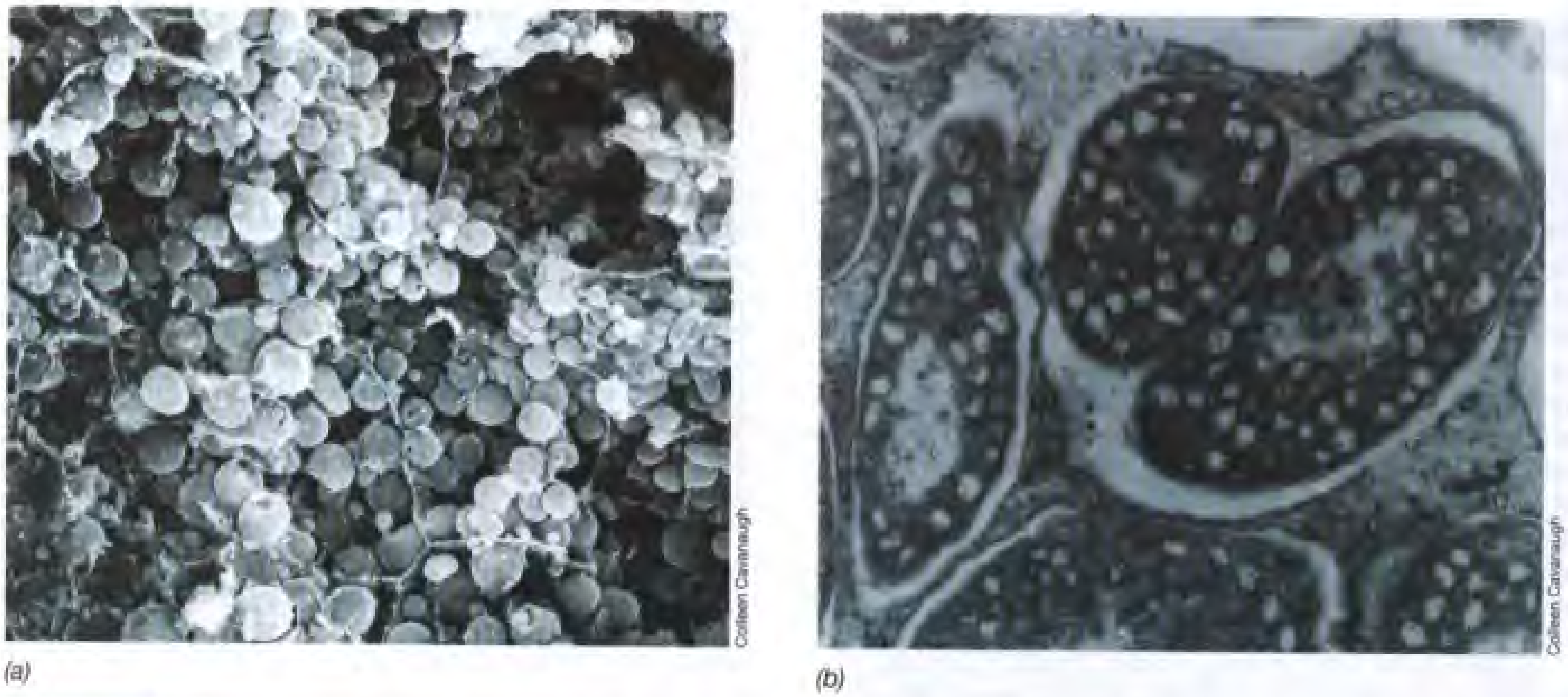


Figura 19.18 Bacterias quimiolitotróficas oxidadoras de azufre asociadas al tejido del trofosoma de los pogonóforos de fuentes hidrotermales submarinas. (a) Micrografía electrónica de barrido del tejido del trofosoma mostrando las bacterias cocoides oxidadoras de azufre. El diámetro de las bacterias es aproximadamente de 3-5 μm. Reproducido con autorización de Science 213:340-342 (1981), © AAAS. (b) Micrografía electrónica de transmisión de bacterias en una sección transversal de tejido del trofosoma. Las células aparecen frecuentemente en parejas y rodeadas por una membrana externa de origen desconocido.

marina y sirve como prueba adicional de que el sulfuro geotérmico penetra en el gusano.

Se ha sugerido también una relación entre nutrición animal y otros quimiolitotrofos (por ejemplo, los oxidadores de H_2 y las bacterias nitrificantes). Se ha demostrado que los simbiontes metanotrofos desempeñan una función nutritiva en los animales que viven asociados simbióticamente a almejas gigantes, que crecen cerca de emanaciones naturales de gases en aguas relativamente poco profundas del Golfo de México (*véase* Figura 12.16). Aunque no son exactamente autotrofos (el CH_4 es un compuesto orgánico), estos simbiontes proporcionan a los animales su sustento, en este caso mediante la oxidación de CH_4 como fuente de energía.

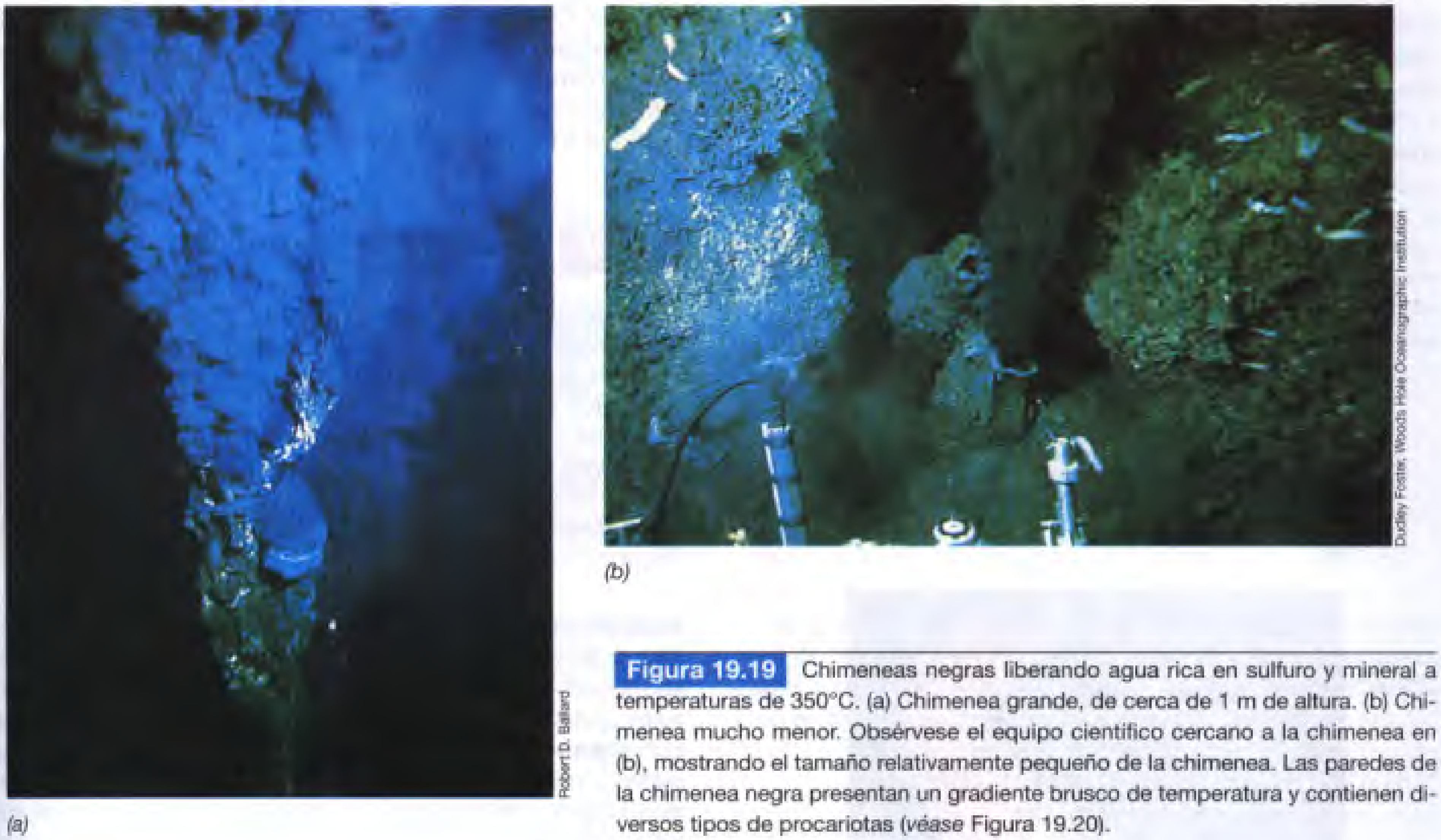
Agua muy caliente: chimeneas negras y montañas marinas

Las grandes profundidades marinas originan presiones enormes que afectan a las propiedades físicas del agua. A 2600 metros de profundidad, la temperatura de ebullición del agua es de unos 450°C. En algunas fuentes muy calientes (pero sin que se alcance la ebullición), los fluidos salen a temperaturas de 270-380°C (*véase* Figura 19.16) y teóricamente podría ser un hábitat para bacterias hipertermofílicas (*véanse* Sección 6.10 y Capítulo 13). El fluido hidrotermal emitido por las chimeneas negras contiene abundantes sulfuros metálicos, especialmente sulfuros de hierro, y se enfría rápidamente al entrar en contacto con el agua fría del mar. Los sulfuros metálicos se precipitan y forman una torre alrededor del punto de emisión, que se conoce como «chimenea» (Figura 19.19). Aunque los procariotas en realidad no viven en un fluido hidrotermal tan caliente, tanto las bacterias termófilas como las hipertermófilas viven en el *gradiente* agua marina-fluido hidrotermal, que se forma cuando el agua caliente se mezcla con el agua fría del mar. Por ejemplo, en las paredes del tubo de la chimenea se encuentran abundantes procariotas termofílicos, como *Methanopyrus*, una arquea metanogénica que oxida el H_2 y ofrece un gran interés desde el punto de vista evolutivo (*véase* Capítulo 13). La presencia de especies de *Bacteria* y de *Archaea* en las paredes de la chimenea se detecta fácilmente usando la tecnología FISH (*véanse* Figura 19.20 y Sección 18.4).

Además de las chimeneas negras, las *montañas marinas* constituyen un hábitat para los procariotas. Estos volcanes sumergidos, localizados principalmente en el Océano Pacífico, en la placa tectónica, expulsan minerales férricos y agua extremamente caliente. Aunque no se han estudiado tan extensamente como las chimeneas negras, hay pruebas de la existencia de procariotas termófilos en esas montañas marinas y de su liberación al océano durante las erupciones.

Metazoos y chimeneas

Sorprendentemente, algunas chimeneas de las fuentes hidrotermales también están colonizadas por metazoos, especialmente por el pequeño gusano tubícola *Alvinella* (Figura 19.21*a*). *Alvinella*, también conocida como «*gusano de Pompeya*», crece en la superficie externa de la chimenea y tolera el agua extremadamente caliente que emite la surgencia. Las mediciones realizadas en su hábitat natural indican que la temperatura interna del animal puede alcanzar los 80°C, lo cual hace que sea el más termotolerante de to-

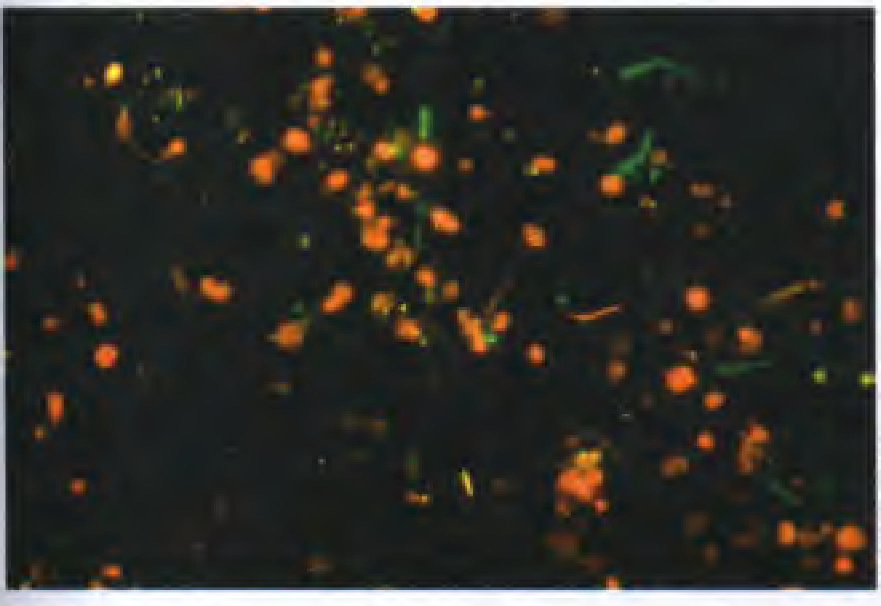


Robert D. Ballard

Dudley Foster, Woods Hole Oceanographic Institution

Figura 19.19 Chimeneas negras liberando agua rica en sulfuro y mineral a temperaturas de 350°C. (a) Chimenea grande, de cerca de 1 m de altura. (b) Chimenea mucho menor. Obsérvese el equipo científico cercano a la chimenea en (b), mostrando el tamaño relativamente pequeño de la chimenea. Las paredes de la chimenea negra presentan un gradiente brusco de temperatura y contienen diversos tipos de procariotas (*véase* Figura 19.20).

dos los animales conocidos. La superficie de *Alvinella* está cubierta de bacterias filamentosas simbióticas, posiblemente quimiliototrofos (Figura 19.21*b*). Aunque se ignora si estos simbiontes nutren al gusano tal como hacen los simbiontes que viven en los grandes gusanos tubícolas y en los mejillones (*véase* Figura 19.17), las bacterias filamentosas son claramente una fuente de alimento para *Alvinella*; se ha podido observar a estos gusanos saliendo de sus tubos y alimentándose directamente de los epibiontes en la colonia de gusanos circundante.



Christian Jeanthon

Figura 19.20 Tinción filogenética de material procedente de una chimenea negra de Snake-Pit, en la cordillera submarina del Atlántico Medio (a 3500 m de profundidad). Se conjugó un colorante verde fluorescente con una sonda de rRNA 16S del dominio *Bacteria* y un colorante rojo con una sonda de rRNA 16S para el dominio *Archaea* (*véanse* Secciones 11.6 y 18.4). El número de células tiende a ser más elevado en las regiones externas de la pared de la chimenea (próximas a los 2°C del agua marina), y a disminuir en la región interior. El fluido hidrotermal que pasa a través de la chimenea estaba a 300°C.

Se desconoce el mecanismo de resistencia al calor de *Alvinella*. Pero la existencia de un animal con semejante tolerancia al calor demuestra que la estructura celular eucariota puede soportar temperaturas mucho más elevadas de lo que se había creído. Esto, a su vez, indica que pueden existir más microorganismos eucariotas termófilos (aunque el más termófilo que se conoce de todos los eucariotas, un hongo, crece sólo a 62°C) (*véase* Sección 6.10).

✓ 19.8 Revisión de conceptos

Las fuentes hidrotermales submarinas son surgenicas donde la actividad volcánica genera fluidos que contienen elevadas cantidades de fuentes de energía inorgánica, que pueden ser utilizadas por las bacterias quimiolitotróficas. Estas bacterias fijan CO_2 autotróficamente a carbono orgánico, parte del cual es consumido por los animales de las profundidades marinas. Las fuentes hidrotermales submarinas son hábitat donde los productores primarios en vez de ser fototrofos son quimiolitotrofos.

- ✓ ¿En qué se diferencia química y físicamente una *fuente hidrotermal submarina templada* de una *chimenea negra*?
- ✓ ¿De qué forma se alimentan los pogonóforos gigantes?
- ✓ ¿Qué pruebas hay de la existencia de organismos vivos que puedan crecer a temperaturas >100°C?

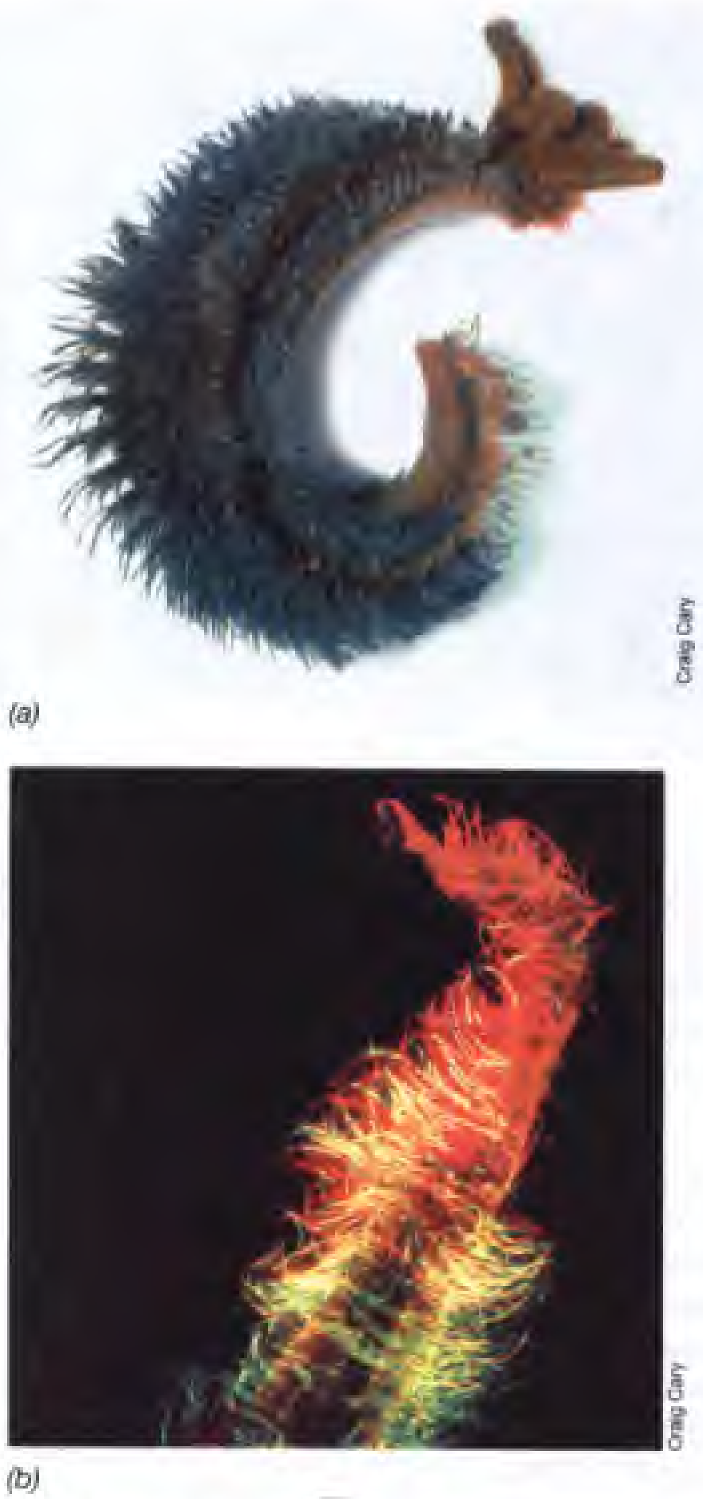


Figura 19.21 El gusano de las chimeneas negras *Alvinella*. (a) Un ejemplar de *A. pompejana*, que mide unos 6 cm de largo. (b) Fotomicrografía fluorescente de bacterias filamentosas creciendo en la superficie de *A. pompejana*. Las células se tiñeron con dos sondas filogenéticas diferentes, amarillo-verdoso y rojo, cada una de las cuales reacciona con el rRNA 16S de un grupo diferente de proteobacterias (una de las principales divisiones del dominio *Bacteria*, *véase* Capítulo 12). El diámetro de los filamentos es de aproximadamente 5 μm.

IV CICLO DEL CARBONO Y DEL OXÍGENO

El ciclo global del carbono depende de la actividad tanto de los microorganismos como de los macroorganismos y está estrechamente ligado al ciclo del oxígeno. Debido al aumento de las emisiones de CO_2 a causa de la actividad humana, el ciclo del carbono es objeto de un renovado interés. Los científicos tratan de entender mejor la magnitud de los reservorios de carbono, de los principales sumideros de CO_2 y las velocidades de reciclado dentro y entre compartimentos, para impedir catástrofes planetarias, como el calentamiento global. Vamos a tratar aquí los principios generales del ciclo microbiano del carbono, con especial referencia a los procesos anóxicos.

19.9 Ciclo del carbono

Considerado globalmente, el carbono circula por todos los reservorios de la Tierra que lo contienen: la atmósfera, el medio terrestre, los mares y otros ambientes acuáticos, sedimentos y rocas, y en la biomasa (Figura 19.22). Tal como veremos, el ciclo del carbono y el del oxígeno están estrechamente relacionados, ya que la fijación de CO_2 por fototrofos oxigénicos libera O_2 y mucha de la materia orgánica es oxidada a CO_2 a través de la respiración aeróbica (*véase* Figura 19.22).

Reservorios de carbono

El mayor reservorio de carbono lo constituyen las rocas y sedimentos de la corteza terrestre (*véase* Tabla 19.3), pero el tiempo de reciclado es tan grande que las salidas de dicho compartimento son relativamente insignificantes consideradas a escala humana. Tomando como referencia los organismos vivos, una gran cantidad de carbono orgánico se encuentra en las plantas terrestres. Esto representa el carbono de los bosques y praderas y constituye el principal lugar de fijación fotosintética de CO_2. Sin embargo, la materia orgánica muerta, llamada *humus*, contiene mayor cantidad de carbono que los seres vivos. El **humus** es una mezcla compleja de materia orgánica. Procede parcialmente de los constituyentes de los microorganismos del suelo que han resistido la descomposición y, en parte, también del material resistente de las plantas. Algunas sustancias húmicas son muy estables, con un tiempo de reciclado de unos cuarenta años, aunque otras se descomponen mucho más rápidamente. Por ejemplo, algunas sustancias húmicas pueden ser aceptores de electrones en la respiración anaeróbica (*véase* Sección 17.13).

El medio más rápido de transferencia global del carbono es mediante el CO_2 de la atmósfera. El CO_2 es retirado de la atmósfera principalmente por la fotosíntesis de las plantas terrestres y vuelve a ella a través de la respiración de los animales y de los microorganismos quimioorganotróficos. El análisis de los diversos procesos indica que el aporte de CO_2 más importante que llega a la atmósfera proviene de la descomposición de la materia orgánica muerta, incluyendo el humus, llevada a cabo por microorganismos. Recientemente, sin embargo, la actividad humana ha aumentado alarmantemente la reserva de CO_2 atmosférico. Por ejemplo, en los últimos 40 años, los niveles de CO_2 han aumentado un 12%.

Importancia de la fotosíntesis en el ciclo del carbono

La única vía importante de producción de carbono orgánico nuevo en nuestro planeta procede de la fotosíntesis y de la quimiosíntesis (fijación de CO_2 por quimiolitotrofos);

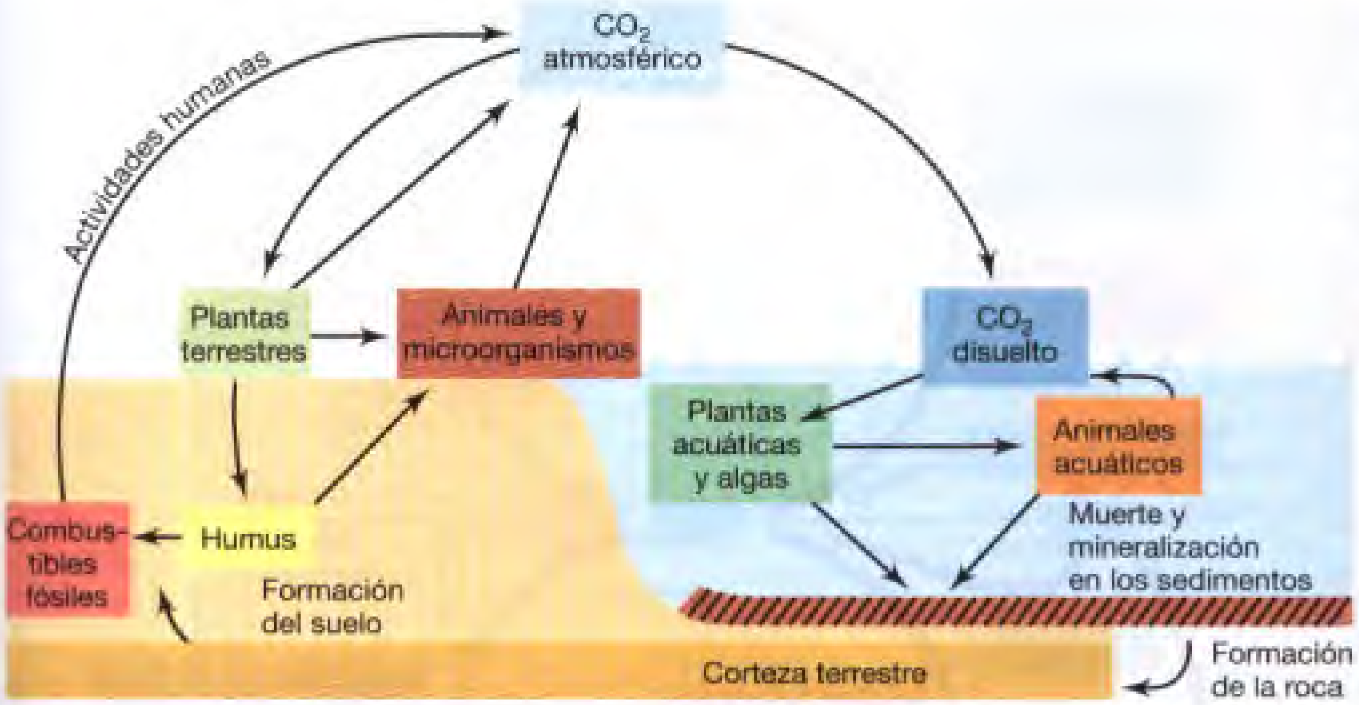


Figura 19.22 Ciclo del carbono. El ciclo del carbono y el del oxígeno están estrechamente relacionados, ya que la fotosíntesis oxigénica elimina CO_2 y produce O_2, mientras que la respiración produce CO_2 y elimina O_2 (*véase* Sección 19.5). El ciclo del carbono en la subsuperficie profunda puede ser tan importante como lo es en la superficie de la tierra (*véase* el Cuadro de texto «Vida microbiana en las profundidades de la Tierra»), aunque no se dispone de estimaciones fiables.

probablemente, la mayor parte del carbono procede de la fotosíntesis. Por tanto, los organismos fototróficos se encuentran en la base del ciclo del carbono (Figura 19.22). Los organismos fototróficos se encuentran en la naturaleza casi exclusivamente en hábitat donde hay luz disponible. De ahí que las grandes profundidades marinas y otros hábitat que están permanentemente en la oscuridad carezcan de fototrofos. Los organismos fototróficos oxigénicos pueden dividirse en dos grandes grupos: plantas superiores y microorganismos. Las plantas superiores son los organismos fototróficos que predominan en los ambientes terrestres, mientras que los microorganismos fototróficos son los fotosintetizadores más abundantes en los ambientes acuáticos.

La Figura 19.23 muestra el ciclo redox del carbono. Empezamos por la fotosíntesis. La ecuación global de la fotosíntesis oxigénica es:

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow[\text{luz}]{} (CH_2O) + O_2$$

en la cual (CH_2O) representa materia orgánica en el estado de oxidación de material celular, como los polisacáridos (la principal forma en que la materia orgánica fotosintetizada se almacena en la célula). Los organismos fototróficos también llevan a cabo la respiración, tanto en presencia de la luz como en la oscuridad. La ecuación general de la respiración es la inversa de la anterior:

$$(CH_2O) + O_2 \xrightarrow[\text{luz u oscuridad}]{} CO_2 + H_2O$$

en la que (CH_2O) representa también polisacáridos de reserva. Para que un organismo crezca (es decir, aumente en número de células o de masa) fototróficamente, la tasa de fotosíntesis debe ser superior a la tasa de respiración. Si eso ocurre, parte del carbono fijado a partir del CO_2 en los polisacáridos puede dedicarse a la biosíntesis. El ciclo completo del carbono se construye a partir de un equilibrio neto positivo de la tasa de fotosíntesis sobre la tasa de respiración.

TABLA 19.3 Principales reservorios de carbono en la Tierra

Reservorio	Carbono (gigatoneladas)[a]	Porcentaje del carbono total en la Tierra
Océanos	38×10^3 (>95% es C inorgánico)	0,05
Rocas y sedimentos	75×10^6 (>80% es C inorgánico)	> 99,5
Biosfera terrestre	2×10^3	0,003
Biosfera acuática	1–2	0,000002
Combustibles fósiles	$4{,}2 \times 10^3$	0,006
Hidratos de metano	10^4	0,014

[a] Una gigatonelada son 10^9 toneladas. Datos adaptados de *Science* 290: 291-295 (2000).

Descomposición

El carbono fijado fotosintéticamente es degradado finalmente por varios organismos. En la degradación, se observan dos estados principales de oxidación del carbono: metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2) (Figura 19.23). El CH_4 se produce por la actividad de los metanógenos y el CO_2 por diversos quimioorganotrofos mediante fermentación, por respiración anaeróbica o por respiración aeróbica. En hábitat anóxicos, el CH_4 resulta de la reducción de CO_2 con H_2 y de algunos compuestos como el acetato. Sin embargo, prácticamente, *cualquier* compuesto orgánico puede ser convertido a CH_4 a partir de la actividad combinada de bacterias fotosintéticas y metanógenos. El H_2 generado por la degradación fermentativa de compuestos orgánicos lo consumen los metanógenos (*véase* Sección 17.7 y la próxima sección). El metano producido en hábitat anóxicos es muy insoluble, por lo que es fácilmente transportado a ambientes óxicos, donde es oxidado a CO_2 por los metanotrofos (Figura 19.23). En consecuencia, todo el carbono orgánico revierte posteriormente a CO_2, a partir del cual el metabolismo autotrófico empieza una vez más el ciclo del carbono.

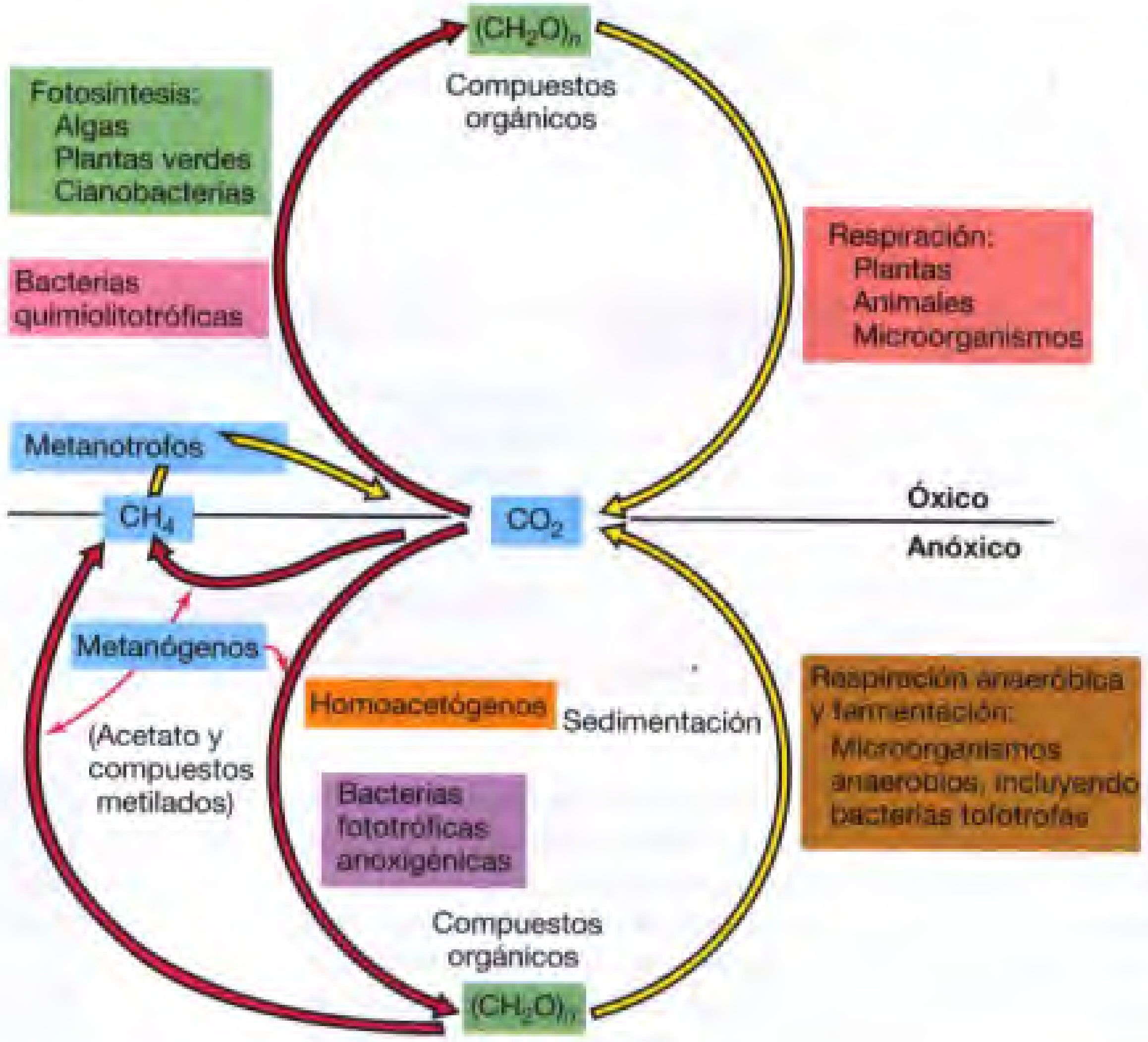

$(CH_2O)_n$
Compuestos orgánicos
Fotosíntesis:
Algas
Plantas verdes
Cianobacterias
Bacterias quimiolitotróficas
Respiración:
Plantas
Animales
Microorganismos
Metanotrofos
CH_4
CO_2
Óxico
Anóxico
Metanógenos
(Acetato y compuestos metilados)
Homoacetógenos
Sedimentación
Respiración anaeróbica y fermentación:
Microorganismos anaerobios, incluyendo bacterias fotótrofas
Bacterias fototróficas anoxigénicas
Compuestos orgánicos
$(CH_2O)_n$

Figura 19.23 Ciclo de oxidación-reducción del carbono; obsérvese la diferencia entre los procesos autotróficos ($CO_2 \rightarrow$ compuestos orgánicos) y heterotróficos. Las flechas amarillas indican oxidaciones; las rojas, reducciones. En los hábitat óxicos la fotosíntesis es principalmente oxigénica, mientras que en los anóxicos es principalmente anoxigénica, debida a la actividad de las bacterias rojas y verdes. En condiciones anóxicas, además de los homoacetógenos y metanógenos, algunas bacterias sulfato reductoras y reductoras de nitrato son también autotróficas. Los metanógenos producen metano, mientras que los metanotrofos lo consumen.

El balance entre la parte oxidativa y la reductora del ciclo del carbono es crítica; los productos del metabolismo de algunos organismos son sustratos para otros. El ciclo necesita mantenerse en equilibrio si es que va a continuar en la forma en que lo ha hecho durante miles de millones de años. Cualquier cambio significativo en las concentraciones de las formas gaseosas del carbono puede tener consecuencias globales (como hemos experimentado debido al aumento de CO_2 atmosférico por la deforestación y la quema de combustibles fósiles). En términos de descomposición, el CO_2 que libera la actividad microbiana excede en mucho al liberado por los eucariotas, y esto es especialmente cierto en el caso de los medios anóxicos que consideraremos a continuación.

✓ 19.9 Revisión de conceptos

Los ciclos del oxígeno y del carbono están altamente interrelacionados a través de las actividades complementarias de los organismos autotróficos y heterotróficos. La descomposición microbiana es la mayor fuente de emisión de CO_2 a la atmósfera.

- ✓ ¿Cómo se hace la materia orgánica nueva?
- ✓ ¿De qué manera están relacionadas la fotosíntesis oxigénica y la respiración?

19.10 Sintrofia y metanogénesis

El metano que se obtiene de la metanogénesis biológica es de extraordinaria importancia en el flujo de carbono de muchos hábitat anóxicos. La producción de metano la realizan los metanógenos, un grupo de microorganismos del dominio *Archaea* compuesto por anaerobios estrictos. En la Sección 17.17, se ha tratado la bioquímica de la metanogénesis y los propios metanógenos en la Sección 13.4. La mayoría de ellos utilizan CO_2 como aceptor final de electrones en la respiración anaeróbica, reduciéndolo a metano. El donador de electrones es, por lo general, H_2 (Figura 19.23). Algunos otros, aunque muy pocos, sustratos, principalmente el acetato, pueden ser convertidos directamente a metano por la acción de los metanógenos. Por tanto, para la conversión de la mayoría de los compuestos orgánicos a CH_4 los metanógenos reciben los sustratos necesarios de otros organismos. Ésta es la labor de los sintrofos.

En la Sección 17.21, se ha tratado la **sintrofia**, en la que dos o más organismos cooperan en la degradación de algunos compuestos, y se ha destacado la energía inherente al proceso. Ahora vamos a considerar las *interacciones ecológicas* de las bacterias sintróficas con otros organismos y su importancia en el ciclo anóxico del carbono en su totalidad. La conversión de sustancias de elevado peso molecular como polisacáridos, proteínas y grasas a CH_4 y CO_2 es fruto de la interacción cooperativa de diversos grupos fisiológicos de procariotas. Por ejemplo, la rotura de un polisacárido típico, la celulosa (Figura 19.24 y Tabla 19.4) es un proceso que inician las *bacterias celulolíticas*, que rompen la molécula de elevado peso molecular, dando lugar a celobiosa (glucosa—glucosa) y a glucosa libre. Después, la acción de los *fermentadores primarios* convierte la glucosa en diversos productos de la fermentación, entre los que destacan acetato, propionato, butirato, succinato, alcoholes, H_2

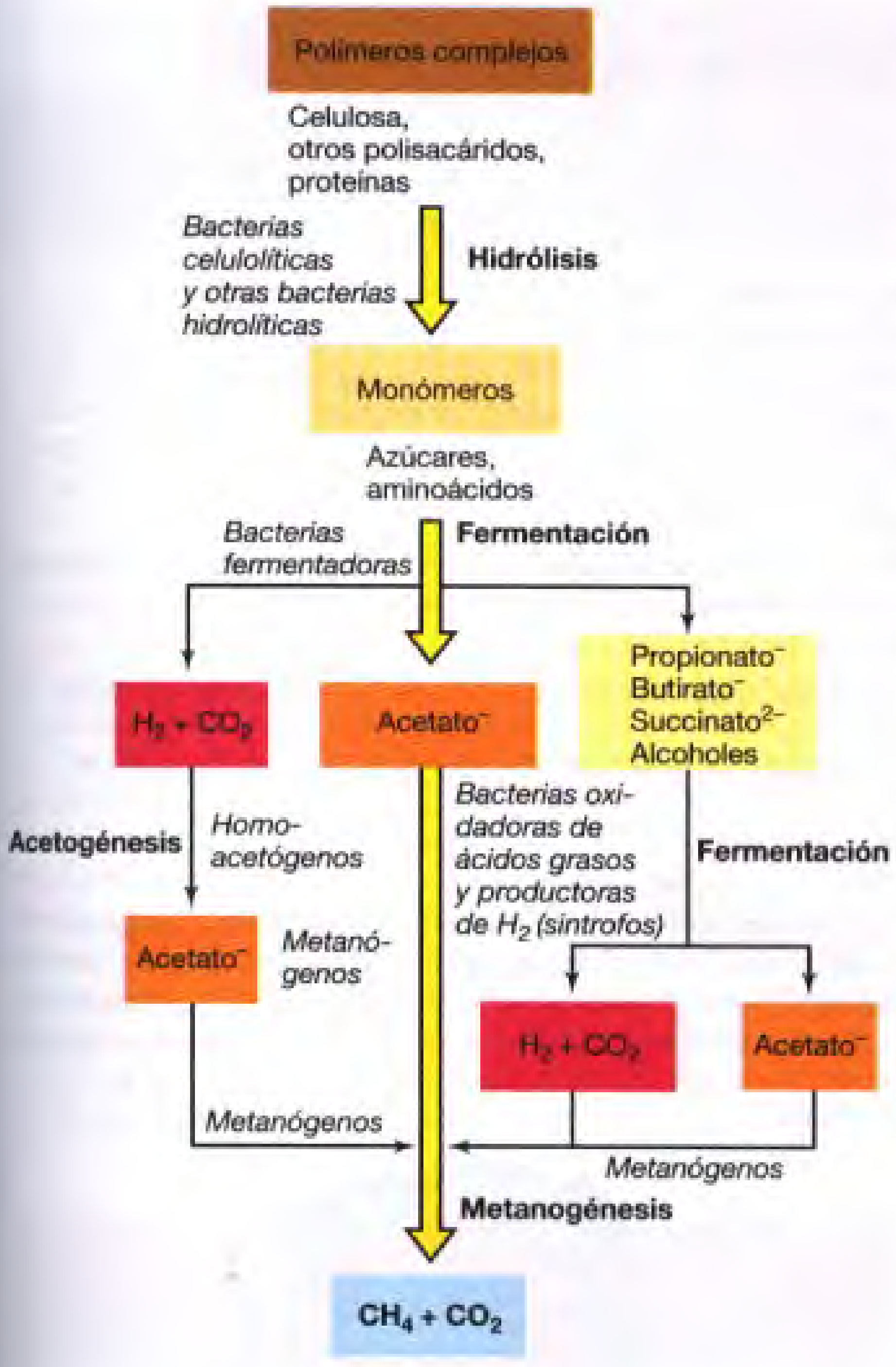

Polímeros complejos
Celulosa,
otros polisacáridos,
proteínas
Bacterias
celulolíticas
y otras bacterias
hidrolíticas
Hidrólisis
Monómeros
Azúcares,
aminoácidos
Bacterias
fermentadoras
Fermentación
$H_2 + CO_2$
Acetato⁻
Propionato⁻
Butirato⁻
Succinato²⁻
Alcoholes
Acetogénesis
Homo-
acetógenos
Bacterias oxi-
dadoras de
ácidos grasos
y productoras
de H_2 (sintrofos)
Fermentación
Acetato⁻
Metanó-
genos
$H_2 + CO_2$
Acetato⁻
Metanógenos
Metanógenos
Metanogénesis
$CH_4 + CO_2$

Figura 19.24 Proceso global de la descomposición anóxica, mostrando la forma en la que varios grupos de anaerobios fermentativos actúan conjuntamente en la conversión de materiales orgánicos complejos en metano (CH_4) y CO_2. El acetato y el H_2O + CO_2 de fermentaciones primarias pueden ser convertidos directamente en metano, aunque el H_2 + CO_2 también pueden ser consumidos por los homoacetógenos. Los sintrofos tienen un papel importante en la descomposición anóxica, debido a que consumen productos de fermentación altamente reducidos mediante una fermentación secundaria. Los sintrofos convierten los ácidos grasos y los alcoholes en sustratos para la metanogénesis y la acetogénesis. La figura muestra los procesos típicos de ambientes en los que las bacterias sulfato reductoras tienen un papel poco importante, como, por ejemplo los sedimentos lacustres, los biorreactores de aguas residuales o el rumen. Cuando abundan otros aceptores de electrones alternativos, como el sulfato en los sedimentos marinos, prevalece la respiración anaeróbica, ya que los sintrofos no pueden competir por los ácidos grasos/alcoholes con las bacterias sulfato redutoras.

y CO_2. Todo el H_2 producido en los procesos fermentativos primarios es consumido inmediatamente por *consumidores de H_2*, tales como metanógenos, homoacetógenos o bacterias sulfato reductoras (en ambientes que contengan suficientes niveles de sulfato). Además, el acetato puede convertirse en metano por la acción de algunos metanógenos, pero todo esto deja una gran cantidad de carbono en forma de ácidos grasos y alcoholes. El catabolismo de estos compuestos lo llevan a cabo los sintrofos.

Función de los sintrofos

Los organismos clave en la conversión de compuestos orgánicos complejos en metano son los *fermentadores secundarios*, especialmente las bacterias oxidadoras de ácidos grasos productoras de H_2. Por ejemplo, *Syntrophomonas wolfei* oxida ácidos grasos entre C_4 y C_8, y produce acetato, CO_2 (si los ácidos grasos tienen un número impar de átomos de carbono) y H_2 (Tabla 19.4). Otras especies de *Syntrophomonas* utilizan ácidos grasos C_{18}, entre ellos algunos ácidos grasos insaturados. *Syntrophobacter wolinii* está especializado en la oxidación de propionato y genera acetato, CO_2 y H_2, mientras que *Syntrophus gentiane* degrada el compuesto aromático benzoato a acetato, H_2 y CO_2 (Tabla 19.4). Estas reacciones contribuyen al crecimiento exuberante de sintrofos en cocultivo con un miembro consumidor de H_2 pero no sucede lo mismo en cultivo axénico. ¿A qué se debe esta diferencia?

Como se ha explicado en la Sección 17.21, el agotamiento de H_2 por el organismo asociado es crucial para el crecimiento de las bacterias sintróficas oxidadoras de ácidos grasos. Cuando las reacciones de la Tabla 19.4 se escriben con todos los reactantes en condiciones estándar (solutos, 1 *M*; gases 1 atm), las reacciones producen cambios de energía libre de signo positivo. Esto es, la $\Delta G^{0\prime}$ (*véase* Sección 5.4) de estas reacciones no libera energía libre (Tabla 19.4). Pero el consumo de H_2 por la bacteria asociada cambia drásticamente el cuadro energético, permitiendo que el sintrofo conserve la suficiente energía para facilitar el crecimiento. La Tabla 19.4 muestra que los valores ΔG (cambio en la energía libre medida en *condiciones reales* en el hábitat) favorecen la conservación energética si la actividad del organismo asociado mantiene la concentración de H_2 muy baja.

De esta forma, con la acción combinada de fermentadores primarios, sintrofos y sus socios consumidores de H_2, prácticamente cualquier compuesto orgánico puede ser de-

TABLA 19.4 Principales reacciones que tienen lugar en la conversión anóxica de compuestos orgánicos a metano[a]

Tipo de reacción	Reacción	Intercambio de energía libre (kJ/reacción)	
		$\Delta G^{0,b}$	ΔG^{c}
Fermentación de glucosa a acetato, H_2 y CO_2	Glucosa + 4 $H_2O \rightarrow$ 2 acetato$^-$ + 2 HCO_3^- + 4 H^+ + 4 H_2	−270	−319
Fermentación de glucosa a butirato, CO_2 y H_2	Glucosa + 2 $H_2O \rightarrow$ butirato$^-$ + 2 HCO_3^- + 2 H_2 + 3 H^+	−135	−284
Fermentación de butirato a acetato y H_2	Butirato$^-$ + 2 $H_2O \rightarrow$ 2 acetato$^-$ + H^+ + 2 H_2	+48,2	−17,6
Fermentación de propionato a acetato, CO_2 y H_2	Propionato$^-$ + 3 $H_2O \rightarrow$ acetato$^-$ + HCO_3^- + H^+ + H_2	+76,2	−5,5
Fermentación de etanol a acetato y H_2	2 Etanol + 2 $H_2O \rightarrow$ 2 acetato$^-$ + 4 H_2 + 2 H^+	+19,4	−37
Fermentación de benzoato a acetato, CO_2 y H_2	Benzoato$^-$ + 6 $H_2O \rightarrow$ 3 acetato$^-$ + 2 H^+ + CO_2 + 3 H_2	+47	−18
Metanogénesis a partir de H_2 + CO_2	4 H_2 + HCO_3^- + $H^+ \rightarrow CH_4$ + 3 H_2O	−136	−3,2
Metanogénesis a partir de acetato	Acetato$^-$ + $H_2O \rightarrow CH_4$ + HCO_3^-	−31	−24,7
Acetogénesis a partir de H_2 + CO_2	4 H_2 + 2 HCO_3^- + $H^+ \rightarrow$ acetato$^-$ + 4 H_2O	−105	−7,1

[a] Datos adaptados de Zinder, S. 1984. Microbiology of anaerobic conversion of organic wastes to methane: Recent developments. *Am. Soc. Microbiol. News* 50:294-298.

[b] Condiciones estándar: solutos, 1 M; gases, 1 atm.

[c] Concentraciones de los reactantes en un ecosistema anóxico de agua dulce típico: ácidos grasos, 1 m*M*; HCO_3^-, 20 m*M*; glucosa, 10 μ*M*; CH4, 0,6 atm; H_2, 10^{-4} atm. Para calcular ΔG a partir de ΔG^{0}, *véase* Apéndice 1.

gradado en los hábitat anóxicos. Los productos finales son CO_2 y CH_4. Esto incluye también, como veremos a continuación, hidrocarburos saturados.

Metabolismo anaeróbico de hidrocarburos

Aunque los hidrocarburos no pueden ser fermentados, sí se pueden catabolizar en condiciones anóxicas, lo que realizan diversas bacterias anaeróbicas, entre ellas las bacterias desnitrificantes, las reductoras de hierro y las reductoras de sulfato (*véanse* Secciones 17.13-17.18). Además, combinaciones de procariotas anaerobios que contienen metanógenos pueden degradar hidrocarburos, dando CH_4 como producto final. Cuando se emplea hexadecano como hidrocarburo modelo, se observa que la formación de CH_4 empieza con las bacterias acetógenas (*véase* Sección 17.16), y que producen acetato más H_2 a partir del hexadecano; después los metanógenos convierten el acetato y el H_2 (más CO_2) en CH_4.

Como hemos visto, la oxidación de hidrocarburo en condiciones óxicas sigue la vía de las enzimas oxigenasa (*véase* Sección 17.22). En condiciones anóxicas, obviamente las oxigenasas no pueden funcionar, por lo que el mecanismo de incorporación de O_2 al hidrocarburo resulta de interés para los bioquímicos microbianos. Aunque el mecanismo no se conoce suficientemente, puede que intervenga una reacción de carboxilación donde el hidrocarburo se convierta en un ácido graso:

$$CH_3(CH_2)_{14}CH_3 + \dot{C}O_2 \rightarrow CH_3\,(CH_2)_{14}CH_2\dot{C}OOH$$

Por oxidación beta, a partir de esa molécula se obtendría acetato de forma semejante a la descrita anteriormente para los oxidadores aeróbicos de hidrocarburo (*véase* Sección 17.23).

El metano, un hidrocarburo, es oxidado en condiciones anóxicas en los sedimentos marinos por agregados celulares que contienen metanógenos y bacterias sulfato reductoras (Figura 19.25*a*). La forma en que estos agregados llevan a cabo la oxidación no está todavía aclarada, aunque se han sugerido dos posibilidades. En una, los metanógenos oxidan metano a CO_2 a través de los pasos inversos a

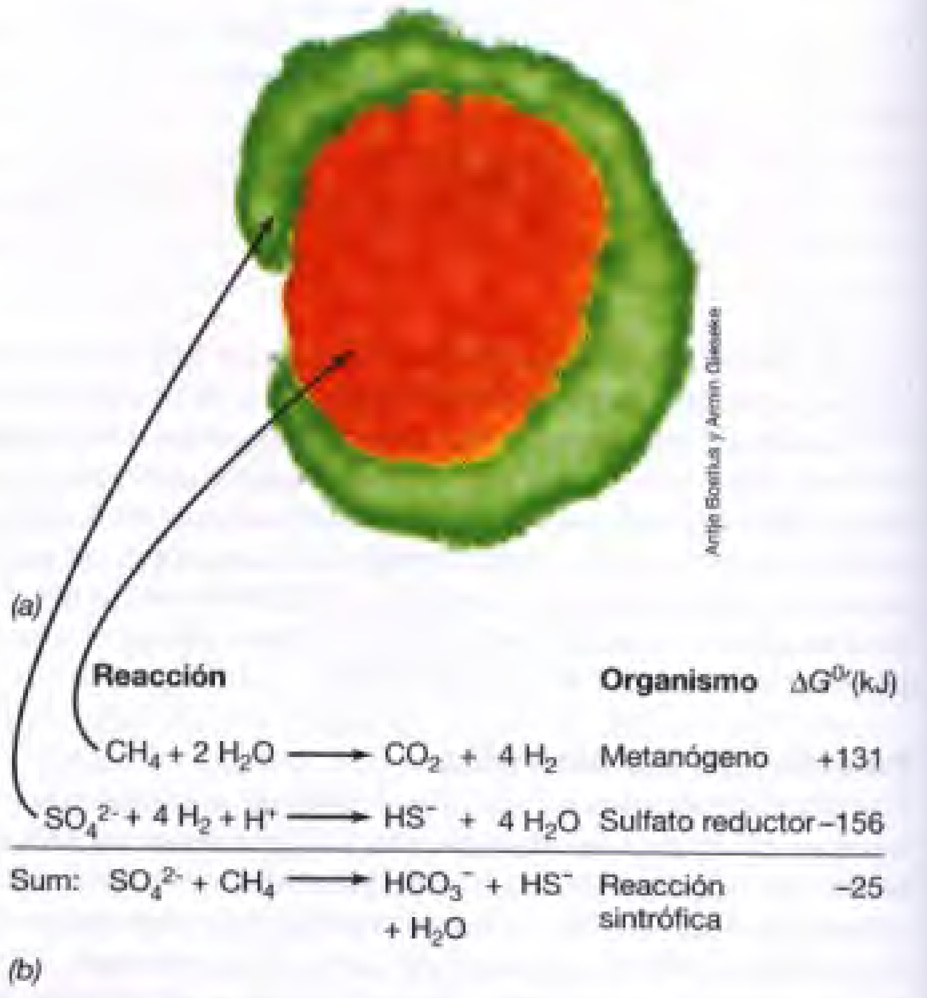


Figura 19.25 Oxidación anóxica de metano. (a) Agregados celulares de sedimentos marinos que oxidan metano. Los agregados contienen bacterias metanógenas (rojo), rodeadas por bacterias sulfato reductoras (verde). Cada tipo celular está teñido con un colorante filogenético FISH diferente (*véase* Sección 18.4). (b) Posible mecanismo de la oxidación sintrófica anóxica de metano en los agregados celulares.

la metanogénesis (*véanse* Sección 17.17 y Figura 19.25*b*). Sin embargo, a menos que un segundo organismo elimine el H_2 producido, esta reacción es menos favorable en términos energéticos. Ésta es presumiblemente la labor del sulfato reductor consumiendo H_2 y produciendo H_2S (Figura 19.25). Alternativamente, el componente metanógeno puede convertir el CH_4 en acetato con la bacteria sulfato reductora oxidando el acetato a CO_2 durante la reducción de sulfato. Cualquiera que sea la forma de trabajo de este consorcio, la oxidación anóxica de metano es un interesante proceso sintrófico en el que dos organismos cooperan para llevar a cabo una reacción que por separado no podrían realizar

Hábitat metanogénicos/acetogénicos

A pesar de la anaerobiosis obligada y de su metabolismo especializado, los metanógenos están muy extendidos en la Tierra. Aunque la metanogénesis sólo se produce en gran cantidad en los ambientes anóxicos, como pantanos y zonas encharcadas, o en el rumen (*véase* Sección 19.11), el proceso también se lleva a cabo en hábitat que normalmente podrían ser considerados óxicos, como los suelos de bosques o las praderas. En dichos hábitat la metanogénesis se produce en microambientes anóxicos, por ejemplo, en el interior de partículas de suelo (*véase* Figura 19.12). La Tabla 19.5 ofrece una visión de conjunto de las diferentes tasas de metanogénesis de distintos tipos de hábitat. Como puede apreciarse, la producción biogénica de metano por las arqueas metanógenas es superior a la de los pozos de gas natural y de otras fuentes abiogénicas. Los eructos de los rumiantes (*véase* Sección 19.11) y el CH_4 liberado por los termes, los arrozales y las zonas pantanosas son las principales fuentes del metano biogénico.

TABLA 19.5 Estimaciones de la liberación de CH_4 a la atmósfera[a]

Fuente	Emisión CH_4 (10^{12} g/año)	
Biótica		
Rumiantes	80-100	
Termes	25-150[b]	
Zonas agrícolas encharcadas	70-120	
Humedales naturales	120-200	
Vertederos	5-70	
Océanos y lagos	1-20	
Tundra	1-5	
Abiótica		
Minería de carbón	10-35	
Emisiones naturales de gas	10-30	
Escapes industriales y de gasoductos	15-45	
Combustión de biomasa	10-40	
Hidratos de metano	2-4	
Volcanes	0,5	
Automóviles	0,5	
Total	350-820	
Total biótico	302-665	81-86% del total
Total abiótico	48-155	13-19% del total

[a] Datos adaptados de las estimaciones de Tyler, S.C. 1991. The global methane budget, pp. 7-58, en E. J. Rogers y W. B. Whitman (eds.), *Microbial Production and Consumption of Greenhouse Gases: Methane, Nitrogen Oxides, and Halomethanes*, American Society for Microbiology, Washington, DC.

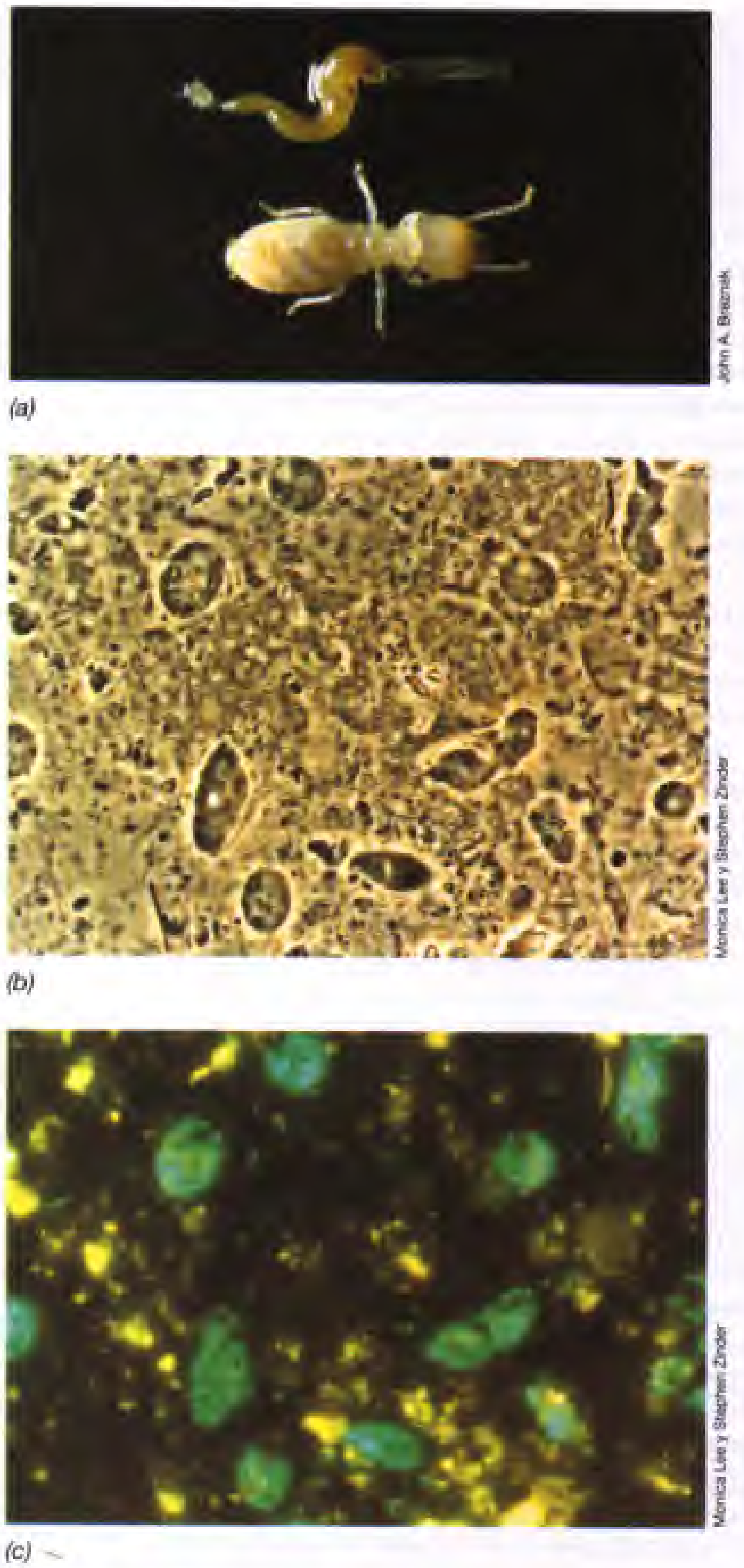
[b] Estimas más recientes indican que el valor más bajo es probablemente el más exacto.

También se han encontrado metanógenos endosimbiontes de ciertos protozoos. Varios tipos de protozoos, como algunas amebas acuáticas de vida libre y flagelados del tubo digestivo de diversos insectos, contienen metanógenos. Los termes, por ejemplo, tienen metanógenos principalmente dentro de las células de los tricomonas que abundan en el intestino del insecto (Figura 19.26). Los metanógenos simbiontes de protozoos tienen forma bacilar y parecen especies de los géneros *Methanobacterium* o *Methanobrevibacter* (*véase* Sección 13.4), pero no se ha establecido su relación exacta con otros metanógenos. Se supone que los metanógenos simbiontes que viven en el intestino de los termes benefician a sus hospedadores al consumir el H_2 que se origina en la fermentación de la glucosa por protozoos celulolíticos. Como muestra la Tabla 16.4, los termes pueden ser la principal fuente de CH_4 de origen biológico.

Un proceso que compite con la metanogénesis es la acetogénesis (*véase* Sección 17.16). En algunos hábitat, por ejemplo el rumen (*véase* Sección 19.11), los homoacetógenos son competidores débiles de los metanógenos, por lo que la metanogénesis se convierte en el proceso dominante en el consumo de H_2. Pero en otros hábitat, como el intestino de los termes, donde hay algo de metanogénesis (Tabla 19.5 y Figura 19.26), la acetogénesis es un proceso de mayor importancia cuantitativa. Todavía no se comprende bien qué es lo que hace que domine una forma de metabolismo anaeróbico; si se consideran meramente los factores energéticos, la metanogénesis a partir de H_2 es un proceso más favorable que la acetogénesis (-131 kJ en vez de -105 kJ, respectivamente) lo cual otorga a los metanógenos una ventaja competitiva. Sin embargo, en el intestino de los termes domina la acetogénesis posiblemente porque: (1) los homoacetógenos en el intestino de alguna manera pueden colocarse más cerca de la fuente de H_2 que los metanógenos y por tanto consumir la mayor parte del H_2 producido por fermentación de la celulosa; (2) a diferencia de los metanógenos, los homoacetógenos pueden crecer de manera quimioorganotrofa con glucosa (procedente de la celulosa), y también por reducción de CO_2 por H_2 (*véase* Sección 17.16); y (3) la naturaleza del alimento (madera) que ingieren los termes contiene mucha lignina mezclada con celulosa y este tipo de material se puede degradar de tal forma que favorece la acetogénesis.

Metanogénesis en relación con la sulfidogénesis

Metanogénesis y acetogénesis son más extensas en aguas dulces anóxicas y en medios terrestres que en sedimentos marinos. La razón es que las bacterias sulfato reductoras, abundantes en sedimentos marinos, donde los niveles de sulfato son elevados, superan a los metanógenos y homocetógenos en la captación del H_2 producido por los fermentadores primarios o por los sintrofos. La base bioquímica es compleja y tiene que ver con que la energía de la reducción de sulfato con H_2 es significativamente ma-



John A. Breznak

Monica Lee y Stephen Zinder

Monica Lee y Stephen Zinder

Figura 19.26 Termes y su metabolismo del carbono. (a) Larva de una termes obrera común (del este de Estados Unidos) donde se muestra el intestino extraído. El animal mide unos 0,5 cm de largo. Su metabolismo anoxigénico se basa en la acetogénesis, aunque también realiza metanogénesis. (b) Microorganismos del intestino del termes *Zootermopsis anguticolis*. Las fotografías (b) y (c) muestran el mismo campo microscópico con dos técnicas de visualización diferentes. (b) Contraste de fases. (c) Epifluorescencia, mostrando el color típico de los metanógenos debido al elevado contenido de la coenzima fluorescente F_{420}. (*véanse* Sección 17.17 y Figura 17.42.) Los metanógenos están en el interior de las células del protozoo *Tricercomitis* sp. Las partículas vegetales dan fluorescencia amarilla. El diámetro promedio de una célula del protozoo es de 15-20 mm. *Véase* la Sección 4.1 para una explicación detallada de la microscopia de fluorescencia.

yor que la reducción de CO_2 con H_2 a CH_4 o a acetato (*véase* Secciones 17.15-17.17). En el agua dulce, sin embargo, donde la sulfidogénesis suele ser muy baja debido a la limitación de sulfato, dominan la metanogénesis y la acetogénesis.

✓ 19.10 Revisión de conceptos

En condiciones anóxicas, la materia orgánica se degrada principalmente a CH_4 y CO_2. Gran parte del CH_4 se forma a partir de la reducción de CO_2 por H_2 suministrado por las bacterias sintróficas productoras de H_2, que dependen del consumo de H_2 para equilibrar su energía. Desde el punto de vista global, el aporte biogénico de CH_4 es mucho mayor que el abiogénico.

- ✓ ¿Qué clase de organismos crecen en cocultivo con *Syntrophomonas*?
- ✓ ¿Cuál es el producto final de la acetogénesis? ¿En qué hábitat anóxico es mayor la acetogénesis que la metanogénesis?
- ✓ ¿Por qué la metanogénesis a partir de H_2 no es un proceso importante en los sedimentos marinos?
- ✓ ¿Cómo se oxida el CH_4 en ausencia de O_2?

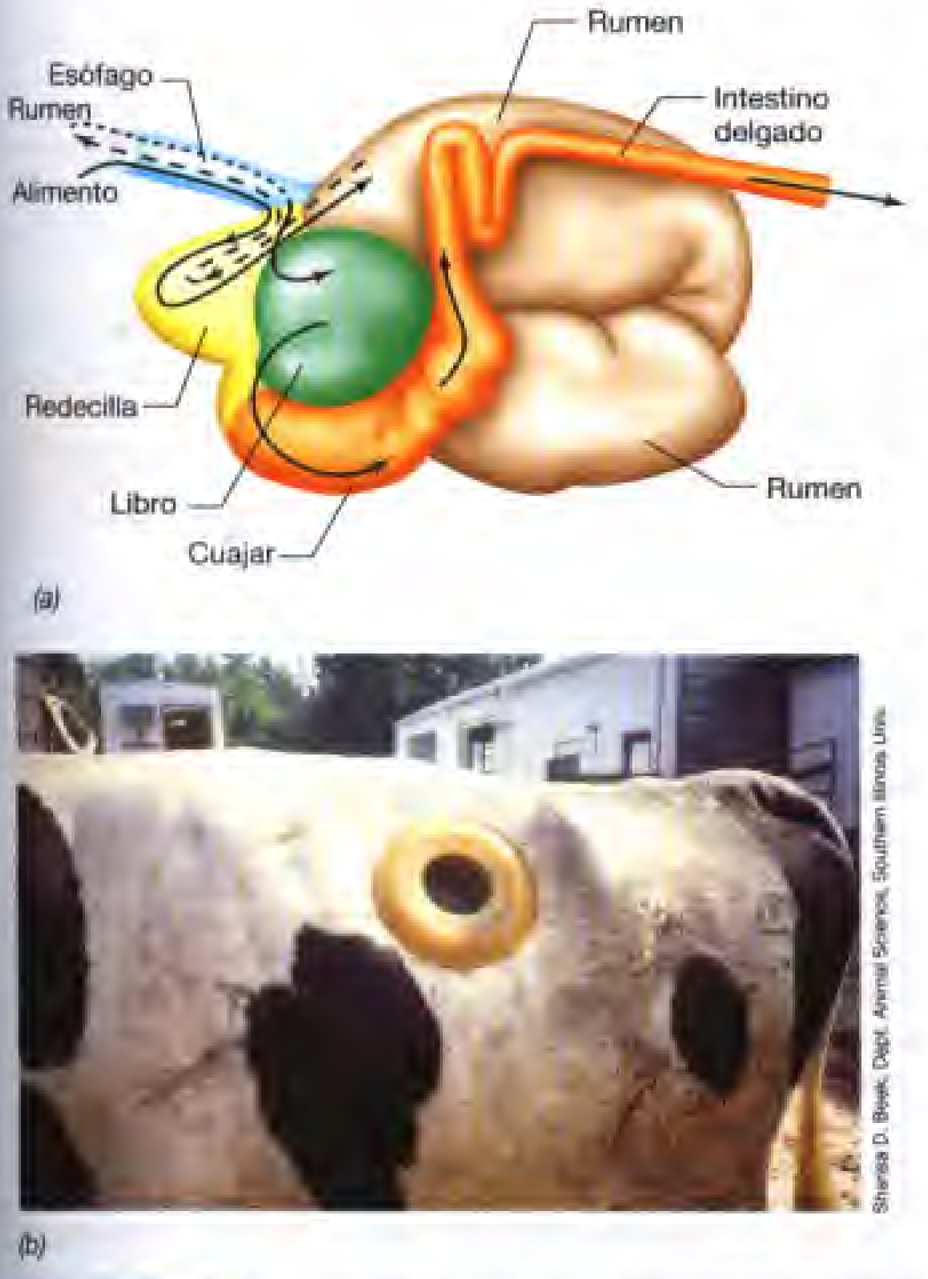
19.11 Ciclo del carbono en animales rumiantes

Los rumiantes son mamíferos herbívoros que poseen un órgano especial, el **rumen**, en cuyo interior se lleva a cabo la digestión de la celulosa y de otros polisacáridos vegetales mediante la actividad de poblaciones microbianas. Algunos de los animales domésticos más importantes, como las vacas, las ovejas y las cabras, son rumiantes. Dado que la economía de la alimentación humana depende en gran manera de estos animales, la microbiología del rumen tiene un significado económico considerable.

Anatomía y actividad del rumen

La mayor parte de la materia orgánica de las plantas terrestres se encuentra en forma de polisacáridos insolubles, siendo la *celulosa* el más importante de ellos. Los mamíferos, como casi todos los animales, carecen de las enzimas necesarias para digerir la celulosa, pero todos los animales que se alimentan principalmente de hierba y plantas con hojas metabolizan la celulosa utilizando microorganismos como agentes digestivos. El rumen, como lugar de digestión de la celulosa, posee algunas características singulares, como su tamaño relativamente grande (100-150 litros en una vaca, 6 litros en una oveja) y su posición en el tubo digestivo, ya que es el órgano donde va el alimento ingerido *antes* de llegar al estómago, que es ácido. Una temperatura elevada constante (39°C), un pH constante (6,5) y la naturaleza anóxica del rumen son también factores significativos para su funcionamiento general. Se trata de un órgano que trabaja de manera casi continua y que, en algunos aspectos, puede considerarse análogo a un quimiostato microbiano (*véase* Sección 6.7).

La Figura 19.27 muestra las relaciones del rumen con otras partes del sistema digestivo de los rumiantes. El conocimiento del proceso digestivo y microbiológico del rumen ha sido posible gracias a la posibilidad de crear una *fístula* en una vaca u oveja, lo que permite alcanzar el rumen y tomar muestras para analizarlas (Figura 19.27*b*). El alimento llega a la redecilla y es bombeado rápidamente al rumen o panza, donde es mezclado con saliva, que contiene bicarbonato, y allí es homogeneizado mediante un movimiento rotatorio durante el cual tiene lugar la fermentación microbiana. Este peristaltismo tritura la celulosa y la convierte en una fina suspensión, que facilita la adherencia microbiana. La masa de alimento pasa gradualmente a la redecilla, donde se forman unas porciones llamadas *rumias* que regresan a la boca por regurgitación y son masticadas otra vez. Estos sólidos finamente divididos, y bien mezclados con saliva, son engullidos de nuevo, pero esta vez el material pasa directamente al libro y termina en el cuajar, que es un órgano más parecido a un verdadero estómago (condiciones ácidas). Aquí se inicia el proceso digestivo químico, que continúa en el intestino delgado y en el grueso.



Sherisa D. Beak, Dept. Animal Science, Southern Illinois Univ.

Figura 19.27 El rumen. (a) Diagrama del rumen y del sistema gastrointestinal de una vaca. El alimento se desplaza desde el esófago al rumen o panza, donde, después de ser regurgitado, viaja a la redecilla o bonete, al libro, al cuajar y a los intestinos, por este orden. El libro es una cavidad ácida, análoga al estómago de los animales monogástricos como cerdos y humanos. (b) Foto de una vaca Holstein fistulada. La fístula es una entrada para el muestreo que permite acceder al rumen. Las vacas y ovejas fistuladas son muy útiles en el estudio tanto de la microbiología del rumen como de la nutrición de los rumiantes.

Fermentación microbiana en el rumen

El alimento permanece en el rumen de nueve a doce horas. Durante este tiempo las bacterias y los protozoos celulolíticos hidrolizan la celulosa, obteniéndose el disacárido celobiosa y unidades de glucosa libre. La glucosa liberada experimenta entonces una fermentación bacteriana en la que se producen **ácidos grasos volátiles**, principalmente *acético*, *propiónico* y *butírico*, y los gases *dióxido de carbono* y *metano* (Figura 19.28). Los ácidos grasos atraviesan la pared del rumen y pasan a la sangre. Desde allí van a los tejidos, donde son oxidados por las células, que los utilizan como la principal fuente de energía. Además de sus funciones digestivas, los microorganismos del rumen sintetizan aminoácidos y vitaminas, siendo la principal fuente de esos nutrientes esenciales para el animal. El rumen contiene procariotas en gran cantidad (10^{10}-10^{11} bacterias/g fluido de rumen). La mayoría de las bacterias aparecen fuertemente adheridas a la materia vegetal y a las partículas de comida. Estos materiales avanzan por el conducto gastrointestinal del animal, donde se ve sometido a otros procesos digestivos similares a los de los animales no rumiantes. Muchas de las células microbianas formadas en el rumen son digeridas en el conducto gastrointestinal y constituyen la principal fuente de proteínas y vitaminas del animal. El hecho de que la proteína microbiana pueda recuperarse hace que en el aspecto nutricional los rumiantes sean superiores a los no rumiantes cuando tienen que subsistir a base de alimento deficiente en proteínas, como es el caso de la hierba.

Las bacterias del rumen

Las reacciones químicas que tienen lugar en el rumen son complejas y requieren la actividad combinada de diversos microorganismos. Siendo el rumen anóxico, las bacterias dominantes son anaeróbicas. Además, dado que en la conversión de celulosa en CO_2 y CH_4 interviene una cadena alimentaria microbiana con varios eslabones, puede esperarse encontrar una variedad de anaerobios (Tabla 19.6).

Diferentes bacterias del rumen hidrolizan polímeros, como la celulosa, convirtiéndolos en azúcares, de los cuales, por fermentación, se producen ácidos grasos. *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus albus* son los anaerobios celulolíticos más abundantes en el rumen. Aunque ambos organismos producen celulasas, *Fibrobacter*, una bacteria Gram negativa, contiene celulasa periplasmática para romper la celulosa (*véase* Sección 4.9); el organismo, por tanto, debe permanecer adherido a la fibrilla de celulosa mientras la digiere. *Ruminococcus*, por otra parte, produce una celulasa que es secretada al rumen, donde degrada la celulosa fuera de la célula bacteriana. El resultado final es el mismo en ambos casos: glucosa libre disponible para los anaerobios fermentativos. Si un rumiante pasa del consumo de celulosa a una alimentación rica en almidón (cereales, por ejemplo), se desarrollarán bacterias digestoras de almidón, como *Ruminobacter amylophilus* o *Succinomonas amylolytica*. Cuando la dieta es baja en almidón, estos organismos se encuentran en minoría. Si un animal se alimenta a base de heno de leguminosas, que es rico en pectina, *Lachnospira multiparus*,

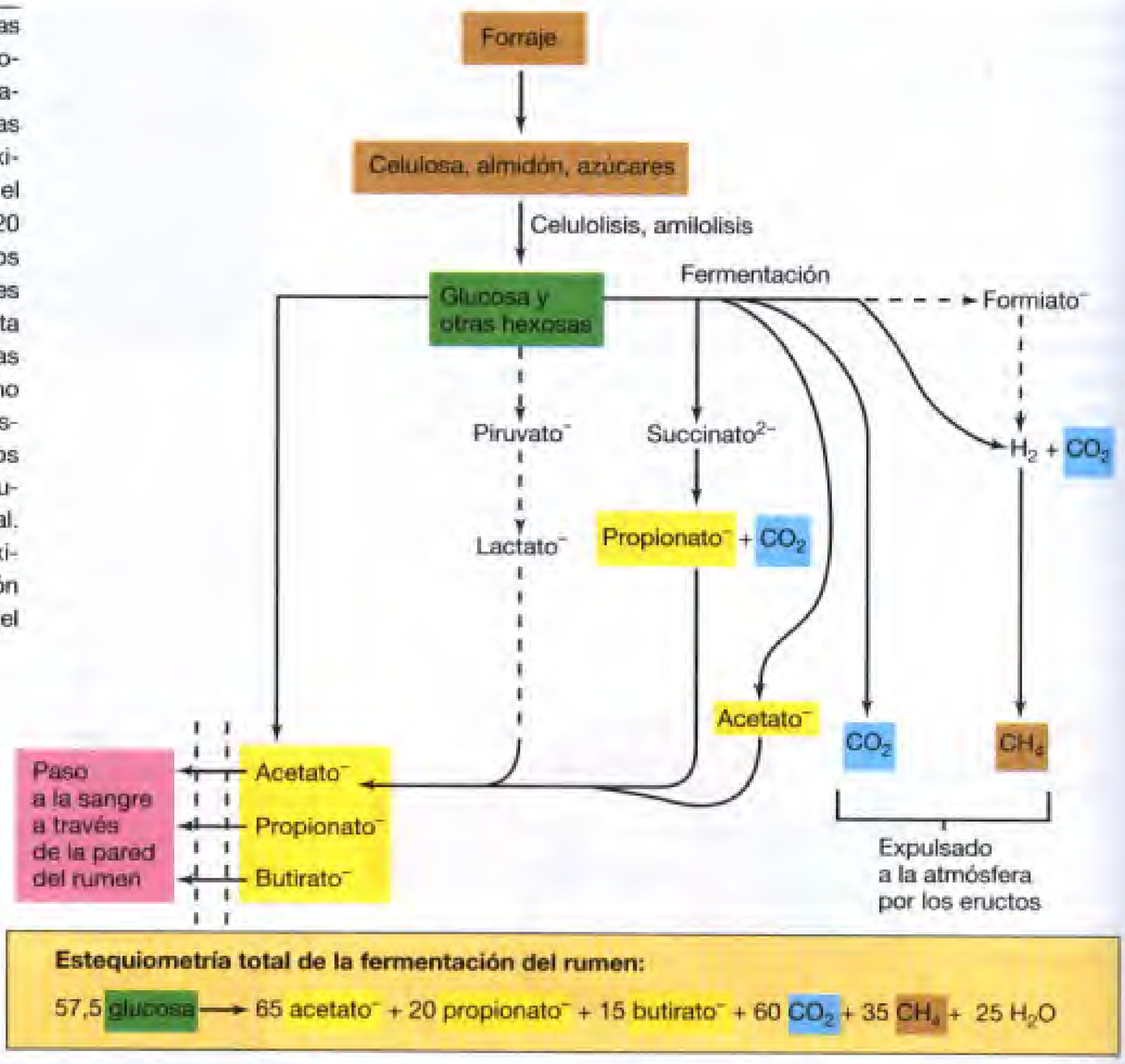

Forraje
Celulosa, almidón, azúcares
Celulolisis, amilolisis
Glucosa y otras hexosas
Fermentación
Formiato⁻
Piruvato⁻
Succinato²⁻
H_2 + CO_2
Lactato⁻
Propionato⁻ + CO_2
Acetato⁻
CO_2
CH_4
Paso a la sangre a través de la pared del rumen
Acetato⁻
Propionato⁻
Butirato⁻
Expulsado a la atmósfera por los eructos
Estequiometría total de la fermentación del rumen:
57,5 glucosa → 65 acetato⁻ + 20 propionato⁻ + 15 butirato⁻ + 60 CO_2 + 35 CH_4 + 25 H_2O

Figura 19.28 Reacciones bioquímicas en el rumen. El sustrato principal, la glucosa, y los productos finales aparecen destacados con un color; las líneas discontinuas indican vías menores. Los niveles aproximados de ácidos grasos volátiles en el rumen son: acetato, 60 m*M*; propionato, 20 m*M*; butirato, 10 m*M*. Los ácidos grasos volátiles son consumidos por los rumiantes y convertidos en proteína animal. Por esta razón, las bacterias sintróficas oxidadoras de ácidos grasos (*véase* Sección 19.10) no son componentes significativos del ecosistema microbiano del rumen. Los ácidos grasos volátiles son consumidos por los rumiantes y convertidos en proteína animal. Por esta razón, las bacterias sintrofas oxidadoras de ácidos grasos (*véase* Sección 19.10) no son componentes esenciales del ecosistema microbiano del rumen.

digestora de pectina, será una bacteria corriente en la microbiota de su rumen (Tabla 19.6).

Algunos productos de la fermentación de la microbiota sacarolítica del rumen son utilizados como fuente de energía por otras bacterias del rumen. Así, el *succinato* se convierte en *propionato* y CO_2 (Figura 19.28), por la acción de *Schwartzia*, y el *lactato* es fermentado a *acético* y a otros ácidos por *Selenomonas* y *Megasphaera* (Tabla 19.6). El hidrógeno producido en el rumen mediante procesos fermentativos nunca se acumula, ya que es utilizado rápidamente por los metanógenos para reducir CO_2 a CH_4. Otra fuente de H_2 y CO_2 para los metanógenos es el *formiato* (Figura 19.28). En el rumen se acumula gran cantidad de CH_4 y CO_2, siendo la composición media de un 65% de CO_2 y de un 35% de CH_4. Los eructos del rumiante expulsan estos gases al exterior. El acetato no llega a convertirse en CH_4 en el rumen porque el tiempo de retención es demasiado corto para que se puedan desarrollar metanógenos acetotróficos, que suelen crecer muy lentamente (*véase* Sección 13.4). Además, las bacterias sintróficas degradadoras de ácidos grasos (*véase* Sección 19.10) no tienen un papel importante en el rumen porque el propio animal es un sumidero importante de ácidos grasos (Figura 19.28). Esto es, con el propionato y el butirato siendo consumidos por el animal (*véase* Figura 19.28), los procesos sintróficos de conversión son innecesarios en el rumen (Tabla 19.4 y Figura 19.24).

Protozoos y hongos del rumen

Además de procariotas, el rumen posee una biota característica de protozoos (aproximadamente 10^6/ml), compuesta casi exclusivamente de ciliados (*véase* Sección 14.8). Muchos de estos protozoos son anaerobios estrictos, una característica que no es frecuente en los eucariotas. A pesar de que los eucariotas no son necesarios para la fermentación en el rumen, contribuyen de manera decisiva al conjunto del proceso. Algunos pueden hidrolizar la celulosa y el almidón, y fermentar la glucosa produciendo los mismos ácidos orgánicos que las bacterias (Tabla 19.6). Los protozoos del rumen también ingieren bacterias para alimentarse, por lo que se cree que controlan el número de bacterias del rumen.

En el rumen también hay hongos anaeróbicos, que se sabe que ejercen alguna función en los procesos digestivos de los rumiantes. Se trata generalmente de especies que alternan una forma flagelada y otra filamentosa; los estudios en cultivo axénico demuestran que pueden fermentar la celulosa a ácidos grasos volátiles. *Neocalimastix*, por ejemplo, es un hongo anaerobio estricto que fermentan glucosa a formato, acetato, lactato, etanol, CO_2 y H_2. Aunque es un eucariota, carece de mitocondrias y citocromos y, en

Tabla 19.6 Características de algunos procariotas del rumen

Organismo	Tinción de Gram	Dominio Filogenético[a]	Morfología	Movilidad	Productos de la fermentación	DNA (GC mol %)
Degradadores de celulosa						
Fibrobacter succinogenes[b]	Negativo	B	Bacilo	–	Succinato, acetato, formiato	45-51
Butyrivibrio fibrisolvens[c]	Negativo	B	Bacilo curvado	+	Acetato, formiato, lactato, butirato, H_2, CO_2	41
Ruminococcus albus[b]	Positivo	B	Coco	–	Acetato, formiato, H_2, CO_2	43-46
Clostridium lochheadii	Positivo	B	Bacilo (esporas)	+	Acetato, formiato, butirato, H_2, CO_2	—
Degradadores de almidón						
Prevotella ruminicola	Negativo	B	Bacilo	–	Formiato, acetato, succinato	40-42
Ruminobacter amylophilus	Negativo	B	Bacilo	–	Formiato, acetato, succinato	49
Selenomonas ruminantium	Negativo	B	Bacilo curvado	+	Acetato, propionato, lactato	49
Succinomonas amylolytica	Negativo	B	Ovalado	+	Acetato, propionato, succinato	—
Streptococcus bovis	Positivo	B	Coco	–	Lactato	37-39
Degradadores de lactato						
Selenomonas lactilytica	Negativo	B	Bacilo curvado	+	Acetato, succinato	50
Megasphaera elsdenii	Positivo	B	Coco	–	Acetato, propionato, butirato, valerato, coproato, H_2, CO_2	54
Degradadores de succinato						
Schwartzia succinovorans	Negativo	B	Bacilo	+	Propionato, CO_2	46
Degradadores de pectina						
Lachnospira multiparus	Positivo	B	Bacilo curvado	+	Acetato, formiato, lactato, H_2, CO_2	—
Metanógenos						
Methanobrevibacter ruminantium	Positivo	A	Bacilo	–	CH_4 (a partir de $H_2 + CO_2$ o de formiato)	31
Methanomicrobium mobile	Negativo	A	Bacilo	+	CH_4 (a partir de $H_2 + CO_2$ o de formiato)	49

[a] B, *Bacteria*; A, *Archaea*.

[b] Estas especies también degradan xilano, un polisacárido muy abundante en la pared celular de las plantas (*véase* Sección 17.25).

[c] También degrada almidón.

consecuencia, vive obligatoriamente de forma fermentativa. Sin embargo, sus células contienen un orgánulo de oxidorreducción llamado *hidrogenosoma*, que produce H_2 y que hasta ahora sólo se ha encontrado en eucariotas primitivos (*véanse* Secciones 14.2, 14.4 y 14.8) Los hongos del rumen desempeñan también una función importante en la degradación de polisacáridos distintos de la celulosa, como la degradación parcial de la lignina (el compuesto que refuerza las paredes celulares de las plantas leñosas), la hemicelulosa y las pectinas.

Dinámica del ecosistema del rumen

Una de las características principales del rumen es su *constancia*. Estudios realizados en diferentes especies de rumiantes en distintas partes del mundo demuestran que la microbiota comensal es básicamente la misma, cambiando únicamente las proporciones de cada población en función del tipo de dieta de cada especie de rumiante. Además, la naturaleza y cantidad de ácidos grasos volátiles producidos (Figura 19.28) y los niveles de CO_2 y CH_4 en el rumen son relativamente constantes en las distintas especies.

De vez en cuando, se producen cambios en la composición microbiana del rumen que pueden causar enfermedades, o incluso, la muerte del animal. Por ejemplo, si se cambia bruscamente la alimentación de una vaca, dándole cereales en vez de forraje, se observa un crecimiento explosivo de *Streptococcus bovis*, pasando de los valores normales (10^7 células/g, algo insignificante para los números totales de bacterias del rumen) a valores de más de 10^{10} células/g. Esto ocurre porque *S. bovis* crece rápidamente con almidón, presente en gran cantidad en los cereales, mientras que la hierba contiene principalmente celulosa. Al ser una bacteria del ácido láctico (*véase* Sección 12.19), *S. bovis* produce elevadas cantidades de lactato a partir de la fermentación de almidón; esto causa la acidificación del rumen (condición conocida como *acidosis*), y la eliminación de su microbiota normal. Una acidosis grave puede conducir a la muerte del animal. Para evitarla se debe cambiar *paulatinamente* la alimentación a lo largo de varios días, sustituyendo el grano por el forraje. Una introducción lenta de almidón permite que, en vez de *S. bovis*, se seleccionen aquellos microorganismos que producen ácidos grasos volátiles a partir del almidón (Tabla 19.6), lo que evita la interrupción de los procesos bioquímicos normales del rumen.

Otras bacterias fermentadoras de almidón secretan polisacáridos complejos que tienden a atrapar burbujas de gas en el rumen, produciendo un «exceso de gas» que puede comprimir los pulmones y matar al animal si no hay una intervención veterinaria rápida.

Alimentación de los rumiantes y enfermedades transmitidas por los alimentos

En los últimos años ha ido en aumento la preocupación por la seguridad en la alimentación animal, especialmente en el ganado, y su repercusión en la microbiota de estos rumiantes. Por razones económicas, los humanos han alterado drásticamente la dieta de los rumiantes, desde el forraje, la dieta con la cual evolucionó el sistema del rumen, hasta dietas con más almidón. El grano facilita el aumento de peso y hace que la carne para la venta sea más tierna. De esta forma, los animales alimentados con grano van antes al mercado y la carne alcanza más valor. Sin embargo, una dieta basada en almidón afecta no sólo a la microbiota del *rumen*, como se ha podido ver, sino también a la composición microbiana del tracto intestinal *descendente* (Figura 19.27*a*). En especial, se ha visto que el pH del tracto intestinal es más ácido en los animales alimentados con grano. Esta condición permite que las cepas ácido-tolerantes enteropatógenas de *Escherichia coli*, como *E. coli* O157:H7 (*véase* Sección 29.7) predominen sobre las no patógenas, que son menos ácido tolerantes. Cuando se sacrifican los animales alimentados con grano, esas células de *E. coli* pueden adherirse a la carcasa e introducirse en los productos cárnicos, particularmente en la carne picada para hamburguesas y salchichas, lo cual aumenta el riesgo de transmisión de enfermedades transmitidas por alimentos (*véase* Sección 29.7).

Otros animales herbívoros: animales con intestino ciego

Los rumiantes con los que estamos más familiarizados son las vacas y las ovejas. Sin embargo, las cabras, camellos, bisontes, ciervos, renos, caribúes y antílopes también lo son. Caballos y conejos son herbívoros pero no rumiantes. Estos animales poseen sólo un estómago, pero usan como recipiente de la fermentación celulolítica el **ciego**, un órgano digestivo situado en la parte posterior del intestino grueso (inmediatamente antes del ano). El ciego contiene una microbiota celulolítica, responsable de la digestión de la celulosa. No se conoce del todo la microbiota del ciego pero se cree que está compuesta por especies distintas a las del rumen. La microbiota celulolítica de los rumiantes circula a través de un estómago auténtico (ácido), lo que produce su muerte y la convierte en fuente de proteína para el animal. Nutricionalmente, este hecho representa una ventaja de los rumiantes sobre caballos y conejos, en los que la microbiota celulolítica es expulsada con las heces.

✓ 19.11 *Revisión de conceptos*

Los rumiantes son animales que tienen un órgano digestivo especial, el rumen, que es un ecosistema particular donde los microorganismos anaeróbicos digieren alimentos insolubles, tales como celulosa y almidón. Las bacterias, protozoos y hongos del rumen producen ácidos grasos volátiles que utilizan los rumiantes. Además de su papel en el proceso digestivo, los microorganismos del rumen sintetizan vitaminas y aminoácidos que utilizan los rumiantes.

- ✓ ¿Qué condiciones químicas y físicas prevalecen en el rumen?
- ✓ ¿Qué son los ácidos grasos volátiles y qué valor tienen para los rumiantes?
- ✓ ¿Por qué es especialmente preocupante el metabolismo de *Streptococcus bovis* en la nutrición de los rumiantes? ¿Cómo se explica que enfermedades humanas transmitidas por alimentos se deban a las prácticas de alimentación utilizadas en rumiantes?
- ✓ ¿En qué se diferencian los animales con ciego de los rumiantes en cuanto a la anatomía del tubo digestivo?

V OTROS CICLOS CLAVE DE NUTRIENTES

Aunque en términos cuantitativos el carbono es el principal elemento reciclado en la naturaleza, hay muchos otros elementos importantes para el metabolismo de plantas y animales que son reciclados por microorganismos. Entre esos elementos se encuentra el nitrógeno, el azufre y el hierro, cuyos ciclos trataremos a continuación.

19.12 Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno, N, constituyente básico del protoplasma, se encuentra en varios estados de oxidación (*véase* Tabla 17.2). En el Capítulo 17, se han tratado dos de los principales procesos de transformación microbiana del nitrógeno: la *nitrificación*, en la Sección 17.12, y la *desnitrificación*, en la Sección 17.14. Estas transformaciones del nitrógeno y varias más están resumidas en el ciclo de oxidorreducción que muestra la Figura 19.29.

Fijación de nitrógeno

Varias de las reacciones clave de oxidorreducción del nitrógeno que tienen lugar en la naturaleza las llevan a cabo casi exclusivamente microorganismos, por lo que su participación en el ciclo del nitrógeno es de gran importancia (Figura 19.29). Desde el punto de vista de la termodinámica, el nitrógeno gaseoso, N_2, es la forma más estable de este elemento, y esto explica que el reservorio más importante de nitrógeno de la Tierra sea la atmósfera. Contrasta con el caso del carbono, que tiene en la atmósfera un reservorio de poca importancia (CO_2, CH_4). La gran cantidad de energía necesaria para romper el enlace $N\equiv N$ del nitrógeno molecular (*véase* Sección 17.28) significa que la reducción de N_2 es un proceso que requiere gran cantidad de energía. Sólo un número de organismos relativamente reducido puede utilizar N_2 en el proceso que se conoce como **fijación de nitrógeno** ($N_2 + 8\,H^+ + 8\,e^- \rightarrow 2\,NH_3 + H_2$); por tanto, el reciclado del nitrógeno de la Tierra tiene lugar en su mayor parte con las formas más fácilmente disponibles, el amoníaco y el nitrato. Sin embargo, dado que el N_2 constituye, con mucho, el ma-

Procesos clave y procariotas del ciclo del nitrógeno

Procesos	Organismos
Nitrificación ($NH_4^+ \rightarrow NO_3^-$)	
$NH_4^+ \rightarrow NO_2^-$	*Nitrosomonas*
$NO_2^- \rightarrow NO_3^-$	*Nitrobacter*
Desnitrificación ($NO_3^- \rightarrow N_2$)	*Bacillus, Paracoccus, Pseudomonas*
Fijación de N_2 ($N_2 + 8H \rightarrow NH_3 + H_2$)	
Vida libre	
Aerobia	*Azotobacter* Cianobacterias
Anaerobia	*Clostridium*, bacterias fototróficas rojas y verdes
Simbiótica	*Rhizobium* *Bradyrhizobium* *Frankia*
Amonificación (N organico $\rightarrow NH_4^+$)	Pueden hacerla muchos microorganismos

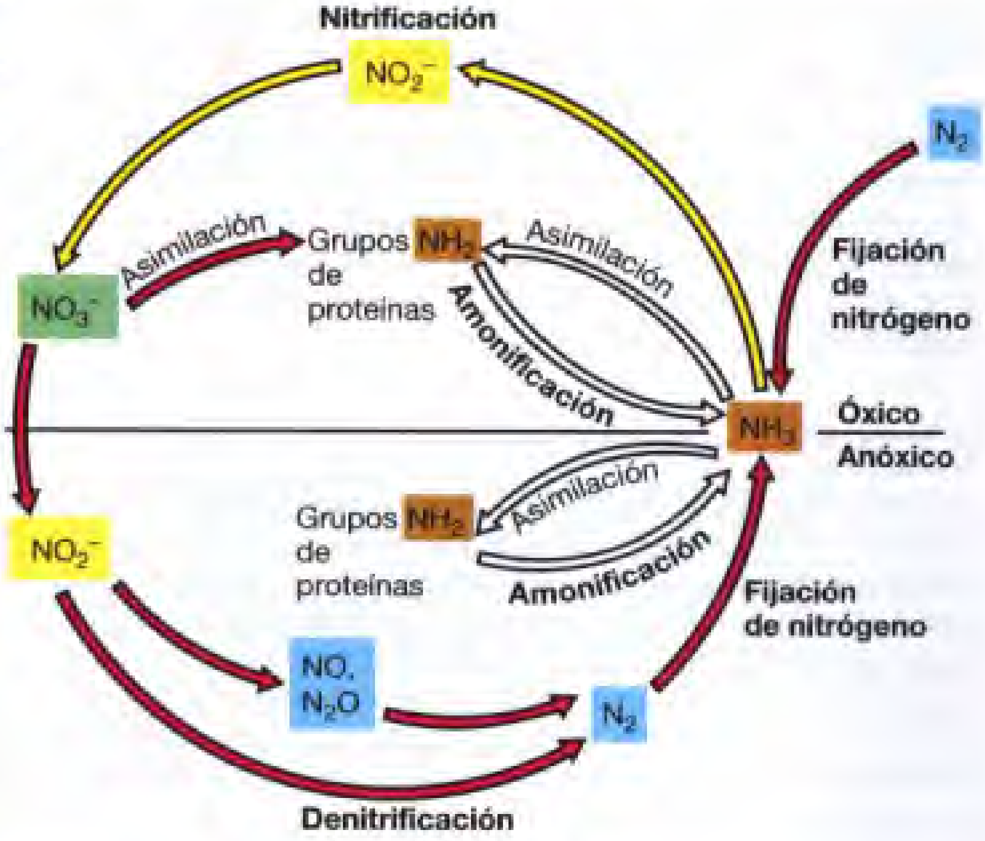


Figura 19.29 Ciclo de óxido-reducción del nitrógeno. Las reacciones de oxidación están representadas por flechas amarillas y las de reducción por rojas.

yor reservorio de nitrógeno disponible para los seres vivos, la capacidad de utilizarlo reviste una gran importancia ecológica. En muchos ambientes, la productividad está limitada por el pequeño aporte de compuestos de nitrógeno combinado, lo que hace muy ventajosa la fijación biológica del nitrógeno. En la Sección 17.28 hemos considerado el proceso básico de fijación de nitrógeno y los procesos agrícolas se tratarán más adelante en este capítulo (Sección 19.22) al describir la fijación simbiótica de N_2 en las leguminosas.

Desnitrificación

En la Sección 17.14 se ha tratado la función del nitrato como aceptor de electrones alternativo. En la mayor parte de las condiciones ambientales, el producto final de la reducción de nitrato es N_2 o N_2O, y la conversión de nitrato a nitrógeno gaseoso se conoce como **desnitrificación** (Figura 19.29). Éste es el principal proceso biológico de formación de N_2. Dado que el N_2 como fuente de nitrógeno es mucho menos utilizable por los organismos que el nitrato, la desnitrificación es un proceso perjudicial, que elimina el nitrógeno fijado del ambiente. Esto puede ser un problema grave si los campos abonados con nitrato se inundan después de las intensas lluvias primaverales. Se establecen rápidamente condiciones anóxicas y la desnitrificación puede ser un proceso importante. Por el contrario, la desnitrificación resulta beneficiosa en el tratamiento de aguas residuales (*véase* Sección 28.2), donde puede eliminarse el nitrato, minimizando así el desarrollo de algas cuando el agua se descarga en lagos y arroyos.

Flujo de amoníaco y nitrificación

El amoníaco se produce durante la descomposición de los compuestos orgánicos de nitrógeno tales como aminoácidos y nucleótidos (**amonificación**, *véase* Figura 19.29); a pH neutro se encuentra en forma de radical amonio (NH_4^+). En condiciones anóxicas, el amoníaco es relativamente estable (pero *véase* Sección 17.12), y es en esa forma en la que predomina el nitrógeno en la mayoría de los sedimentos anóxicos. En los suelos, una gran parte del amoníaco liberado por descomposición aeróbica es reciclado rápidamente y convertido en aminoácidos por las plantas y microorganismos. Dado que el amoníaco es volátil, hay ciertas pérdidas por el suelo (especialmente en los muy alcalinos) por vaporización. Las principales pérdidas de amoníaco hacia la atmósfera se producen en lugares con una densa población animal (por ejemplo en corrales). A escala global, sin embargo, el amoníaco constituye únicamente el 15% del nitrógeno liberado a la atmósfera, puesto que la mayor parte restante lo es en forma de N_2 o N_2O (provenientes de la desnitrificación).

La **nitrificación** es la oxidación de NH_3 a NO_3^-; es uno de los principales procesos de la naturaleza, y ocurre con facilidad en suelos bien drenados a pH neutro por la acción de bacterias nitrificantes (*véanse* Secciones 12.3 y 17.12 y Figura 19.29). Nótese que mientras que la desnitrificación es un proceso de *consumo* de nitrato, la nitrificación lo es de *producción* de nitrato. Si se añade a los suelos materia orgánica rica en proteínas, como el estiércol o aguas residuales, aumenta su tasa de nitrificación. Aunque el nitrato es fácilmente asimilable por las plantas es muy soluble en agua y se lava rápidamente en los suelos que reciben mucho agua de lluvia. Por consiguiente, la nitrificación no es beneficiosa en la práctica agrícola. Por otra parte, el amoníaco tiene carga positiva y es absorbido rápidamente por las arcillas, que están cargadas negativamente.

El amoníaco anhidro se utiliza ampliamente como abono nitrogenado. Normalmente se añaden al abono productos químicos para inhibir el proceso de nitrificación. Uno de los inhibidores más corrientes es la *nitrapirina* (2-cloro-6-triclorometilpiridina, también conocida como N-Serve), un compuesto análogo de la piridina. La nitrapirina interrumpe específicamente el primer paso de la nitrificación, la oxidación de NH_3 a NO_2^- (*véase* Sección 17.12), inhibiendo, por tanto, las dos fases del proceso. Al añadir inhibidores de la nitrificación aumenta la eficacia de los abonos y se evita la contaminación de las aguas con el nitrato lavado de los suelos abonados.

✓ 19.12 Revisión de conceptos

El nitrógeno gaseoso (N_2) es la principal forma de nitrógeno en la Tierra y sólo las bacterias fijadoras de nitrógeno pueden utilizarlo como fuente de nitrógeno. El amoníaco, que se produce por fijación de nitrógeno o por amonificación de los compuestos orgánicos nitrogenados, es asimilado en forma de materia orgánica (aminoácidos, proteínas) o bien oxidado a nitrato por las bacterias nitrificantes. Las pérdidas de nitrógeno en la biosfera son el resultado de la desnitrificación, en la que el nitrato se convierte otra vez en N_2.

- ✓ ¿Qué es la *fijación de nitrógeno* y por qué es tan importante?
- ✓ ¿Cómo se llama el proceso que consiste en $NO_3^- \rightarrow N_2$?
- ✓ ¿De qué manera el compuesto *nitrapirina* es beneficioso para la agricultura y el medio?
- ✓ ¿En qué se diferencia la *nitrificación* de la *desnitrificación*?

19.13 Ciclo del azufre

Las transformaciones del azufre son aún más complejas que las del nitrógeno, debido a la variedad de estados de oxidación que presenta (*véasne* Figura 19.30 y Tabla 17.3) y a que algunas de sus transformaciones se producen en cantidad significativa tanto *químicamente* como por procesos biológicos. En las Secciones 17.15 y 17.10 se han explicado los procesos de reducción de sulfato y de oxidación quimiolitotrófica del azufre, respectivamente. La Figura 19.30 muestra el ciclo de oxidorreducción del azufre y la participación de los microorganismos en las transformaciones del azufre. Aunque son posibles varios estados de oxidación, sólo tres tienen importancia en la naturaleza: −2 (sulfhidrilo, R—SH, y sulfuro, HS^-), 0 (azufre elemental, S^0) y +6 (sulfato, SO_4^{2-}). La mayor parte del azufre de nuestro planeta se encuentra en sedimentos y rocas en forma de minerales de sulfato (principalmente yeso, $CaSO_4 \cdot 2\,H_2O$) y minerales de sulfuro (principalmente pirita, FeS_2), aunque el mar constituye el reservorio más importante de azufre para la biosfera (en forma de sulfato inorgánico). La Figura 19.31 muestra el ciclo global de transporte del azufre; más adelante se explican algunos de los componentes de este ciclo.

Sulfuro de hidrógeno y reducción de sulfato

El sulfuro de hidrógeno (H_2S) es el principal gas volátil de azufre. Esta sustancia se forma principalmente por reducción bacteriana de sulfato ($SO_4^{2-} + 8\,H^+ \rightarrow H_2S + 2\,H_2O + 2\,OH^-$, (Figura 19.30), o por las emisiones geoquímicas de fuentes de sulfuro y volcanes. Aunque el H_2S es volátil, la forma de sulfuro presente en el ambiente depende del pH; por debajo de valores de pH 7 predomina el H_2S, mientras que a pH > 7 predomina el HS^- y el S^{2-}. Las bacterias sulfato reductoras están ampliamente distribuidas en la naturaleza, aunque en muchos hábitat anóxicos, en agua dulce y suelos su actividad se ve limitada por los bajos niveles de sulfato. Debido a la necesidad de donadores orgánicos de electrones (o de hidrógeno molecular, que a su vez procede de la fermentación de compuestos orgánicos) para la reducción de sulfato, la producción de sulfuro se

Procesos clave y organismos procariotas en el ciclo del azufre

Proceso	Organismos
Oxidación de sulfuro/azufre ($H_2S \rightarrow S^0 \rightarrow SO_4^{2-}$)	
Aeróbico	Quimiolitotrofos del azufre (*Thiobacillus, Beggiatoa*, otros)
Anaeróbico	Bacterias fototróficas rojas y verdes, algunos quimiolitotrofos
Reducción de sulfato (anaeróbico) ($SO_4^{2-} \rightarrow H_2S$)	*Desulfovibrio, Desulfobacter,*
Reducción de azufre (anaeróbico) ($S^0 \rightarrow H_2S$)	*Desulfuromonas*, muchas *Archaea* hipertermófilas
Desproporción de azufre ($S_2O_3^{2-} \rightarrow H_2S + SO_4^{2-}$)	*Desulfovibrio*, y otros
Oxidación o reducción de compuestos orgánicos de azufre	($CH_3SH \rightarrow CO_2 + H_2S$) (DMSO → DMS)
Desulfurilación (orgánica–S → H_2S)	Muchos organismos pueden hacerlo

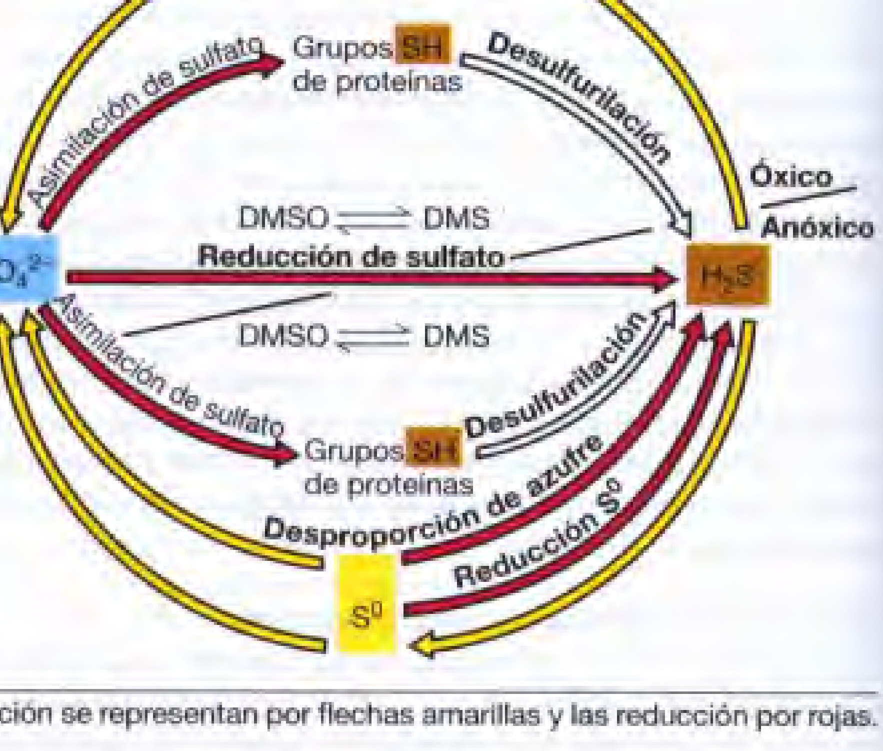


Figura 19.30 Ciclo de óxido-reducción del azufre: las reacciones de oxidación se representan por flechas amarillas y las reducción por rojas. DMSO, dimetilsulfóxido; DMS, dimetilsulfuro.

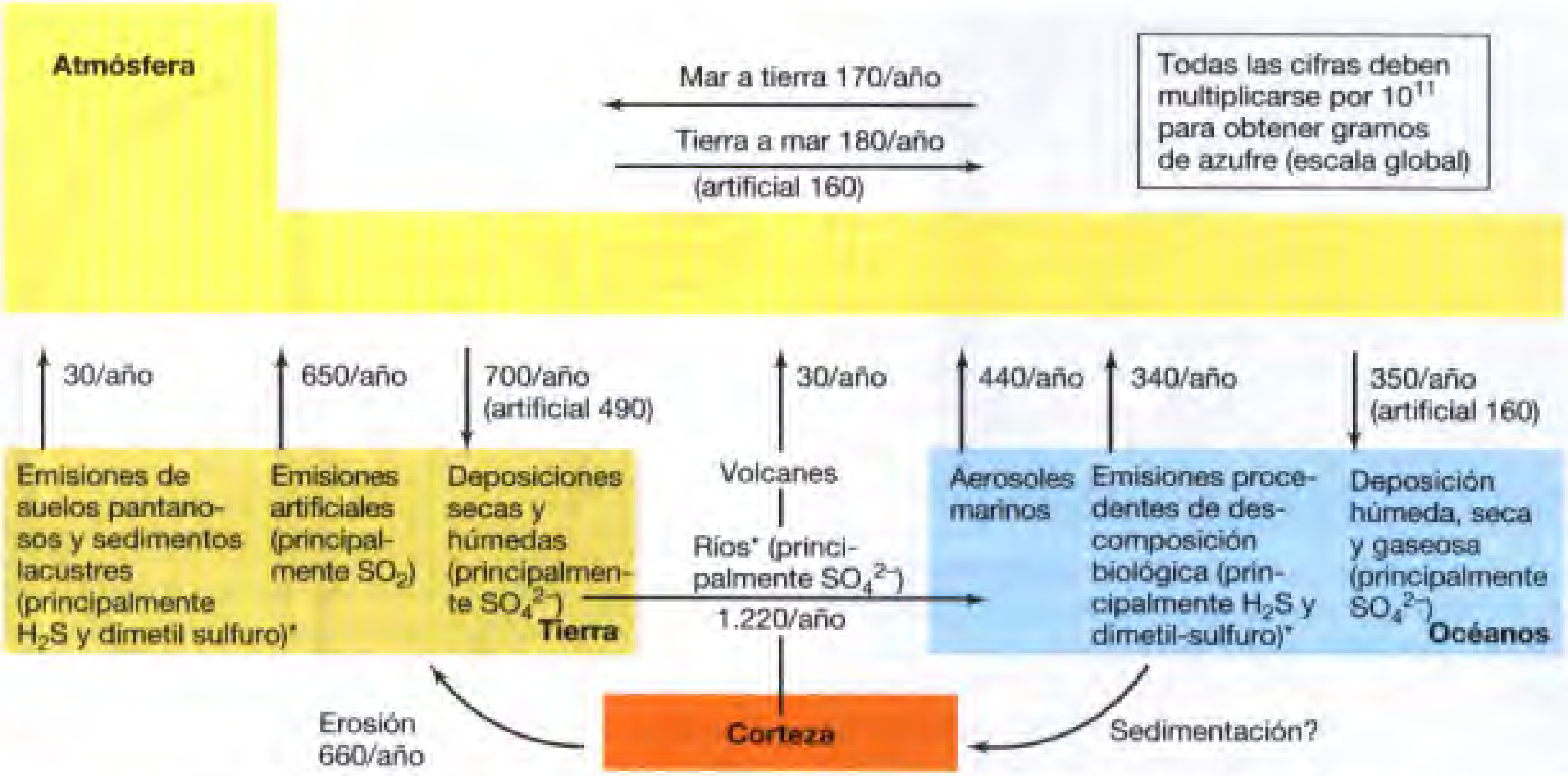

Atmósfera
Mar a tierra 170/año
Tierra a mar 180/año
(artificial 160)
Todas las cifras deben multiplicarse por 10^{11} para obtener gramos de azufre (escala global)
30/año
650/año
700/año
(artificial 490)
30/año
440/año
340/año
350/año
(artificial 160)
Emisiones de suelos pantanosos y sedimentos lacustres (principalmente H_2S y dimetil sulfuro)*
Emisiones artificiales (principalmente SO_2)
Deposiciones secas y húmedas (principalmente SO_4^{2-})
Tierra
Volcanes
Ríos* (principalmente SO_4^{2-})
1.220/año
Aerosoles marinos
Emisiones procedentes de descomposición biológica (principalmente H_2S y dimetil-sulfuro)*
Deposición húmeda, seca y gaseosa (principalmente SO_4^{2-})
Océanos
Erosión
660/año
Corteza
Sedimentación?

Figura 19.31 Balance global del azufre. Las emisiones artificiales provienen de actividades humanas. El asterisco señala los procesos que parcial o totalmente se pueden atribuir a la acción microbiana.

produce únicamente en lugares donde haya una cantidad significativa de materia orgánica. En muchos sedimentos marinos, la tasa de reducción de sulfato está limitada por el carbono, y aumenta significativamente al añadir materia orgánica. Esto es importante porque el vertido de aguas residuales, lodos y basuras en el mar aumenta notablemente la cantidad de materia orgánica de los sedimentos y origina la contaminación marina. El HS^- es tóxico para muchos organismos y su formación a partir de la reducción de sulfato es un peligro potencial. El sulfuro es tóxico porque se combina con el hierro de los citocromos y con otros compuestos celulares esenciales que contienen hierro. La detoxificación en el ambiente del H_2S se lleva a cabo mediante la reacción con compuestos de hierro, para formar FeS insoluble. El color negro de muchos sedimentos donde se produce sulfatorreducción se debe a la acumulación de FeS.

Oxidación-reducción de sulfuro y de azufre elemental

En condiciones óxicas, el sulfuro (HS^-) a pH neutro se oxida rápida y espontáneamente (*véase* Sección 17.10). Las bacterias oxidadoras del azufre, que en su mayor parte son aerobias, catalizan la oxidación de estos compuestos. Sin embargo, por tratarse de una reacción espontánea que se lleva a cabo muy rápidamente, la oxidación del sulfuro ocurre sólo donde el H_2S procedente de las zonas anóxicas más profundas se encuentra con el O_2 que desciende de las zonas óxicas. Además, si hay luz puede producirse también oxidación de SH^-, catalizada por las bacterias fototróficas anoxigénicas del azufre (*véanse* Secciones 12.2, 12.33 y 17.4).

El azufre elemental, S^0, es químicamente estable, pero es oxidado con mucha facilidad por las bacterias oxidadoras de azufre, como *Thiobacillus* (*véanse* Secciones 12.4 y 17.10). El azufre elemental es muy insoluble y las bacterias que lo oxidan se adhieren fuertemente a los cristales de azufre (*véase* Figura 17.26*b*). La oxidación del azufre elemental produce iones de sulfato (SO_4^{2-}) y de hidrógeno, lo que ocasiona una *disminución* del pH característica. A veces, para bajar el pH, se añade azufre elemental a los suelos alcalinos, confiando en que los ubicuos tiobacilos se encarguen del proceso de acidificación.

El azufre elemental, S^0, puede ser tanto reducido como oxidado. La reducción de azufre a sulfuro es una forma de respiración anaeróbica (*véase* Sección 17.15) y constituye un proceso ecológico importante, especialmente entre arqueas hipertermófilas (*véase* Capítulo 13). Aunque las bacterias sulfato reductoras también llevan a cabo esta reacción, en la naturaleza el grueso de la reducción de S^0 ocurre probablemente por la acción de reductores de S^0 filogenéticamente distintos, que son incapaces de reducir SO_4^{2-} a H_2S. Sin embargo, los hábitat de los reductores de S^0 son, por lo general, los de los reductores de sulfato, de manera que, desde el punto de vista ecológico, hay coexistencia entre ambos grupos.

Compuestos de azufre orgánico

Además de las formas *inorgánicas* de azufre, cuya biogeoquímica acabamos de considerar, existe un amplio conjunto de compuestos orgánicos de azufre que son sintetizados por los seres vivos y que también entran en el ciclo biogeoquímico del azufre (Figura 19.31). Muchos de estos compuestos de olor muy fuerte son extremadamente volátiles, por lo que van rápidamente a la atmósfera. El compuesto orgánico de azufre más abundante en la naturaleza es el dimetilsulfuro ($H_3C—S—CH_3$). Se origina principalmente en ambientes marinos como producto de la degradación del propionato de dimetilsulfonio, que es uno de los principales osmorreguladores en las algas marinas (*véase* Sección 6.12). Los microorganismos pueden utilizar el propionato de dimetilsulfonio como fuente de carbono y energía, catabolizándolo a dimetilsulfuro y acrilato; este último compuesto es un derivado del ácido graso propionato y se utiliza para el crecimiento.

La producción microbiana de dimetilsulfuro en la naturaleza es de aproximadamente 45 millones de toneladas anuales. El dimetilsulfuro se libera a la atmósfera, donde experimenta una oxidación fotoquímica dando metanosulfonato ($CH_3SO_3^-$), SO_2 y SO_4^{2-}. El dimetilsulfuro en hábitat anóxicos puede ser utilizado por los microorganismos por lo menos de tres maneras: (1) como sustrato para la metanogénesis (produciendo CH_4 y H_2S); (2) como donador de electrones para la fijación fotosintética de CO_2 por las bacterias fototróficas rojas (produciendo dimetilsulfóxido [DMSO]); y (3) como donador de electrones en el metabolismo energético de algunos quimioorganotrofos y quimiolitotrofos (produciendo también DMSO). El DMSO puede actuar como aceptor de electrones en la respiración anaeróbica (*véase* Sección 17.18), produciendo de nuevo dimetilsulfuro. Hay muchos otros compuestos orgánicos de azufre que actúan en el ciclo global del azufre, incluyendo el metanotiol (CH_3SH), el dimetildisulfuro ($H_3C—S—S—CH_3$) y el disulfuro de carbono (CS_2), pero, en conjunto, la producción y consumo de dimetilsulfuro es la más importante (Figura 19.31).

✓ 19.13 Revisión de conceptos

Las bacterias desempeñan las principales funciones en los procesos tanto de oxidación como de reducción del ciclo del azufre. Las bacterias oxidadoras del sulfuro y del azufre, que a menudo son quimiolitotrofos, producen sulfato, y las bacterias reductoras del sulfato lo utilizan como aceptor de electrones en la respiración anaeróbica, produciendo sulfuro de hidrógeno. Dado que el sulfuro es tóxico y reacciona también con varios metales, la reducción de sulfato es un importante proceso biogeoquímico. El dimetilsulfuro es el principal compuesto orgánico de azufre de significado ecológico.

- ✓ ¿H_2S es *sustrato* o *producto* de las bacterias reductoras del sulfato?
- ✓ ¿Por qué se genera ácido de la oxidación bacteriana del azufre?
- ✓ ¿Qué compuesto orgánico de azufre es el más abundante en la naturaleza?

19.14 Ciclo del hierro

El hierro es uno de los elementos más abundantes de la corteza terrestre. En la superficie de la Tierra, el hierro se presenta en dos estados de oxidación, ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}). El Fe^0 es producto de la actividad humana en la mezcla de menas de hierro ferroso o férrico para obtener hierro fundido. En la naturaleza, por tanto, el ciclo del hierro se da entre las formas ferrosa y férrica; la reducción de Fe^{3+} se da tanto químicamente como a consecuencia de la respiración anaeróbica, y, la oxidación de Fe^{2+} se produce tanto químicamente como a resultas de una forma de metabolismo quimiolitotrófico (Figura 19.32). El único aceptor de electrones capaz de oxidar espontáneamente Fe^{2+} es el O_2. En la Sección 17.11, se discute cómo puede suceder esta reacción a pH neutro con producción de precipitados de hierro férrico altamente insoluble. Por el contrario, a pH bajo, el Fe^{2+} es estable, lo cual permite la proliferación de bacterias acidófilas oxidadoras de hierro.

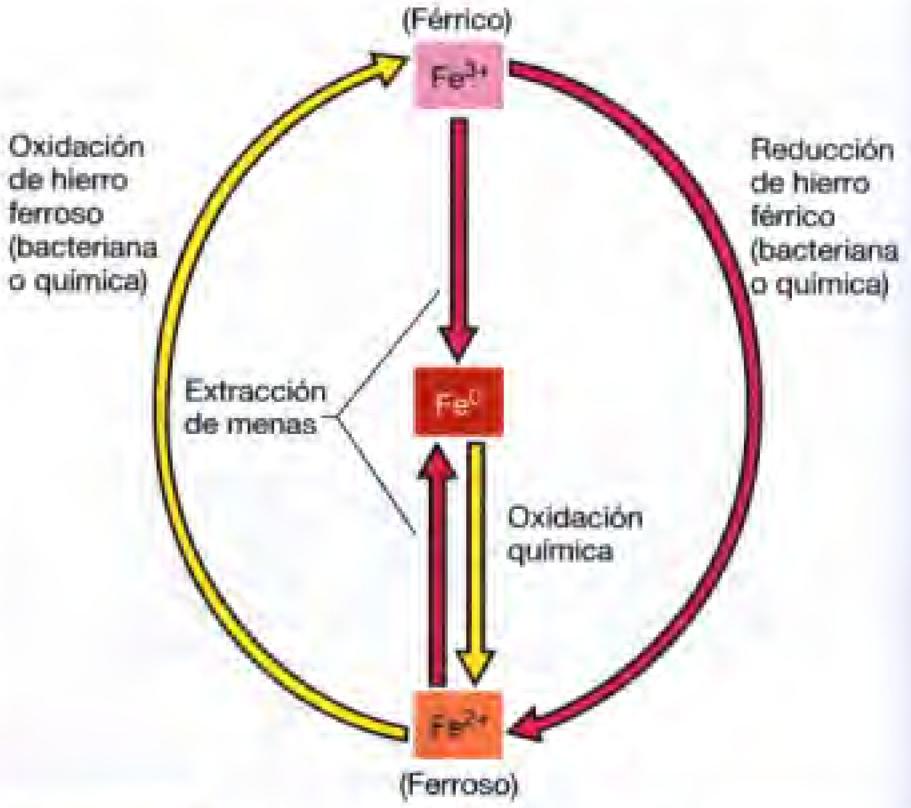

(Férrico)
Fe3+
Oxidación de hierro ferroso (bacteriana o química)
Reducción de hierro férrico (bacteriana o química)
Extracción de menas
Fe0
Oxidación química
Fe2+
(Ferroso)

Figura 19.32 Ciclo de óxido-reducción del hierro. La forma principal del hierro en la naturaleza es Fe^{2+} y Fe^{3+}; Fe^0 es producto de la actividad humana en la extracción de mena de hierro. La oxidación de hierro ferroso es un proceso aeróbico que llevan a cabo los quimiolitotrofos (o químico a pH neutro) y anaeróbico por algunas bacterias fototróficas anoxigénicas y bacterias desnitrificantes. Las oxidaciones se representan mediante flechas amarillas y las reducciones por flechas rojas.

Reducción bacteriana del hierro

Algunos microorganismos utilizan el hierro férrico como aceptor de electrones. La reducción férrica del hierro es muy corriente en suelos encharcados, en turberas y en sedimentos anóxicos de lagos. El movimiento de las aguas del fondo, ricas en hierro, en las turberas anóxicas o en los suelos encharcados, puede producir el transporte de cantidades considerables de hierro ferroso. Cuando estas aguas cargadas de hierro alcanzan las zonas óxicas, el hierro ferroso se oxida químicamente o por las bacterias del hierro (*véase* Sección 17.11) y se producen compuestos férricos, que precipitan formando un depósito marrón (*véase* Figura 17.28*c*). La reacción global de oxidación del hierro ferroso es como sigue:

$$Fe^{2+} + \tfrac{1}{4} O_2 + 2\tfrac{1}{2} H_2O \rightarrow Fe(OH)_3 + 2\ H^+$$

El precipitado de hierro férrico interacciona con otras sustancias no biológicas, como el humus (*véase* Sección 19.9), reduciendo Fe^{3+} a Fe^{2+} (Figura 19.32). El hierro férrico también puede formar complejos con varios componentes orgánicos, que resultan así solubilizados y quedan disponibles para las bacterias reductoras de hierro férrico (*véase* Sección 17.18).

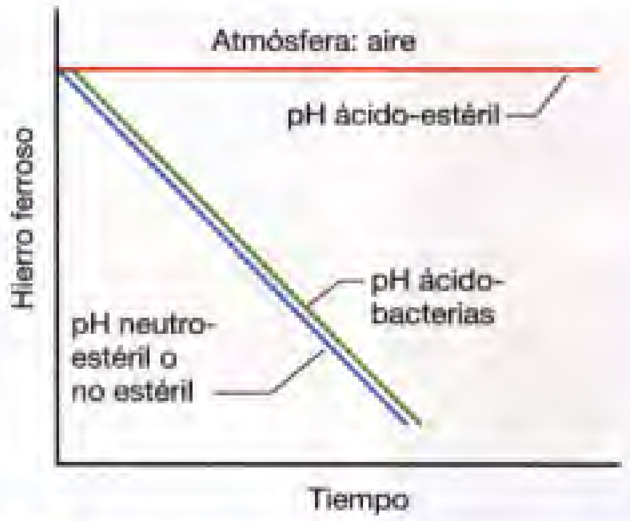


Figura 19.33 Oxidación de hierro ferroso en función del pH y de la presencia de *Thiobacillus ferrooxidans*. Nótese como el Fe^{2+} es estable en condiciones ácidas en ausencia de células bacterianas.

Hierro férrico y oxidación de pirita a pH ácido

En medios no ácidos, el Fe^{2+} es oxidado por las bacterias del hierro, como *Gallionella* y *Leptothrix* (*véanse* Secciones 12.15 y 12.16). Esto ocurre principalmente en las interfases entre las aguas subterráneas anóxicas ricas en hierro y el aire. Sin embargo, a pH bajo, donde el Fe^{2+} es estable, es cuando la oxidación bacteriana de hierro es más importante. Un quimiolitotrofo acidófilo, *Thiobacillus ferrooxidans*, y los oxidadores de hierro acidófilos relacionados oxidan Fe^{2+} a Fe^{3+} a pH extremadamente bajos (Figura 19.33). Sin embargo, en la oxidación de hierro ferroso a férrico, como se genera muy poca energía (*véase* Sección 17.11), estas bacterias tienen que oxidar grandes cantidades de hierro para poder desarrollarse, por lo que, en consecuencia, incluso un número pequeño de células pueden ser responsables de la precipitación de una gran cantidad de hierro. Esta bacteria oxidadora del hierro, que es un acidófilo estricto, se encuentra habitualmente en el drenaje ácido de las minas y en manantiales ácidos; es probable que sea también responsable de la mayor parte del hierro férrico precipitado en ambientes de pH ácido.

Thiobacillus ferrooxidans y *Leptospirillum ferrooxidans* viven en ambientes en los que el ácido sulfúrico es el ácido dominante y donde, además, hay gran cantidad de sulfato. A 20-30°C y pH moderadamente ácido (2-4), parece que *T. ferrooxidans* es el organismo dominante, mientras que a 30-50°C y pH más ácido (1-2) predomina *L. ferrooxidans*. En estas condiciones, el hierro férrico no precipita como hidróxido, sino formando un sulfato mineral complejo llamado *jarosita* [$HFe_3(SO_4)_2(OH)_6$]. La jarosita es un precipitado amarillento o marrón responsable de una de las características del drenaje ácido de las minas, una desagradable coloración amarilla que los mineros norteamericanos llaman «el chico amarillo» (*véanse* Figuras 17.28 y 19.37).

Una de las formas más corrientes de hierro y azufre en la naturaleza es la *pirita*, que tiene como fórmula general FeS_2. Procede de la reacción del azufre con el sulfuro ferroso (FeS) y forma una estructura cristalina altamente insoluble; es muy frecuente en carbones bituminosos y en muchos otros depósitos minerales (Figura 19.34). La oxidación bacteriana de la pirita tiene gran importancia para la aparición de las condiciones de acidez en las actividades mineras (Figura 19.35). Además, la oxidación de la pirita por las bacterias tiene considerable importancia en el proceso llamado *lixiviado microbiano de minerales* (*véase* Sección 19.15). La oxidación de la pirita es una combinación de reacciones catalizadas química y enzimáticamente. En este proceso puede haber dos aceptores de electrones: oxígeno molecular (O_2) e ion férrico (Fe^{3+}).

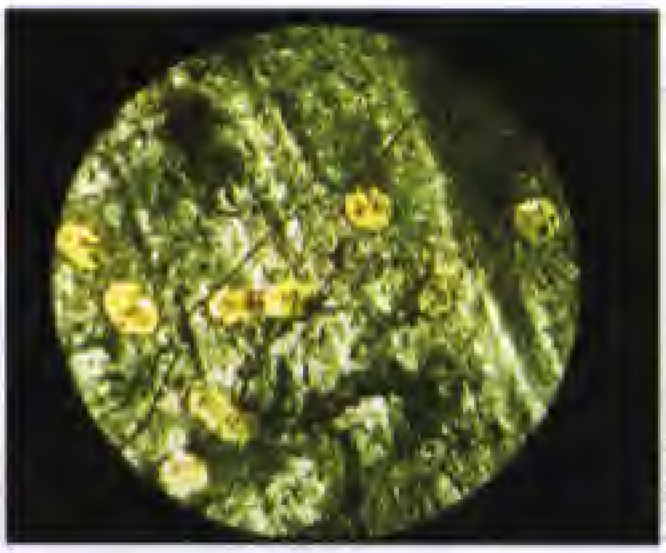

Ravin Donald

Figura 19.34 Pirita presente en el carbón que puede ser oxidada por las bacterias oxidadoras del hierro y del azufre. Sección de una pieza de carbón procedente de la formación Black Mesa en el norte de Arizona (EE.UU.). Los discos esféricos dorados (de alrededor de 1 mm de diámetro) son partículas seccionadas de la pirita, FeS_2.

Cuando la pirita se saca al exterior, como hace la minería, se produce una lenta reacción química con el oxígeno molecular, como se ve en la Figura 19.36. Esta reacción, llamada *reacción iniciadora*, oxida el sulfuro a sulfato y ocasiona las condiciones ácidas bajo las cuales el hierro ferroso que se forma es relativamente estable en presencia de oxígeno. *Thiobacillus ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* catalizan entonces la oxidación de iones ferrosos a férricos. Los iones férricos formados bajo estas condiciones ácidas, al ser solubles, pueden reaccionar espontáneamente con más pirita para oxidarla, produciéndose iones ferrosos y iones sulfato:

$$FeS_2 + 14\,Fe^{3+} + 8\,H_2O \rightarrow 15\,Fe^{2+} + 2\,SO_4^{2-} + 16\,H^+$$

Los iones ferrosos formados son oxidados de nuevo a iones férricos por las bacterias, y estos iones férricos, a su vez, reaccionan con más pirita. Por tanto, la tasa de oxidación de la pirita aumenta progresiva y rápidamente en un proceso que se conoce como *ciclo de propagación*, que se ilustra en la Figura 19.36. En condiciones naturales, algunos de los iones ferrosos generados por las bacterias se escapan y son transportados por las aguas subterráneas hasta cursos de agua cercanos. No obstante, dado que el oxígeno está presente en el drenaje aireado, en estas salidas de agua las bacterias oxidan el hierro ferroso y se forma un precipitado de hierro férrico insoluble.

Drenaje ácido de las minas

La oxidación bacteriana de los minerales de azufre es el principal factor en el **drenaje ácido de las minas**, un problema ambiental frecuente en las zonas donde hay minas de carbón (*véanse* Figuras 19.37 y 17.28*a*). La mezcla del

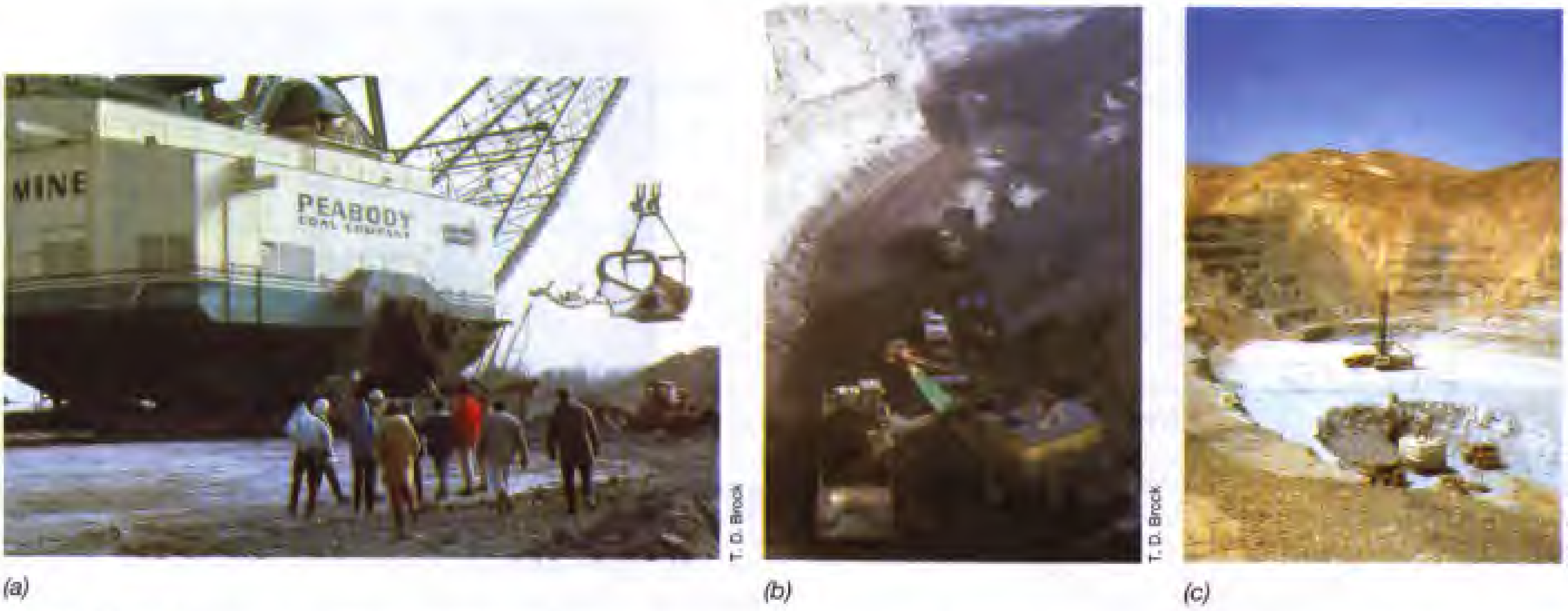

MINE
PEABODY
T. D. Brock
(a)
T. D. Brock
(b)
T. D. Brock
(c)

Figura 19.35 Hábitat microbianos ricos en pirita que se encuentran en los ambientes bituminosos donde se efectúa la extracción de carbón y de cobre. (a) Extracción de carbón bituminoso en una veta minera. La pala transportadora está quitando la tierra para alcanzar la veta de carbón. (b) Veta de carbón. La retirada del carbón bituminoso expone el ambiente al aire. La pirita asociada al carbón (*véase* Figura 19.34) es colonizada por bacterias oxidadoras de hierro. (c) Depósito de mineral de cobre rico en pirita. La extracción del mineral de cobre deja la zona expuesta al aire.

agua ácida de la mina con la de ríos y lagos provoca una degradación grave de la calidad del agua natural porque tanto el ácido como los metales disueltos son tóxicos para la vida acuática (*véanse* Figuras 17.28*a* y 19.37). Además, esas aguas contaminadas no son aptas para el consumo humano ni para el uso industrial. La oxidación de la pirita lleva, en última instancia, a la formación de ácido sulfúrico y de hierro ferroso y se pueden alcanzar valores de pH tan bajos como 2. El ácido formado ataca otros minerales presentes en la roca asociados con el carbón y la pirita, originando la degradación de toda la estructura de la roca. El aluminio, que es uno de los principales elementos formadores de rocas, es sólo soluble a pH bajo; con frecuencia, el Al^{3+} se encuentra en aguas ácidas de las minas a concentraciones elevadas, lo que puede ser tóxico para los organismos acuáticos.

El requerimiento de O_2 en la oxidación de hierro ferroso a férrico explica en parte cómo se desarrolla el drenaje ácido de las minas. En tanto no se extraiga carbón, la pirita no se oxida, pues ni el aire ni las bacterias pueden alcanzarla. Cuando se extrae el carbón (Figura 19.35), entra en contacto con *Thiobacillus ferrooxidans* y con el O_2, lo que hace posible la oxidación de la pirita. El ácido que se forma puede filtrarse a los cursos de agua cercanos (Figura 19.37).

Donde el drenaje ácido de las minas es extenso, hay una gran actividad de la arquea acidófila *Ferroplasma acidophilum*. Se trata de un procariota oxidador de hierro que puede crecer a pH 0 y temperatura de hasta 50°C. *F. acidophilum* forma cintas viscosas adheridas a superficies de

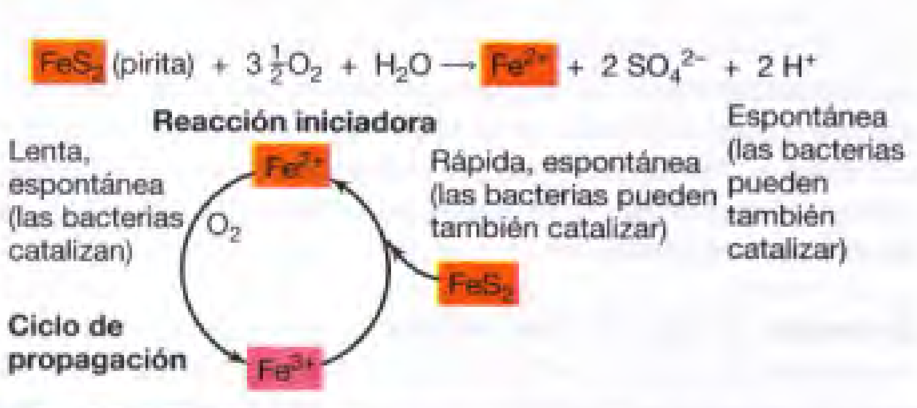

FeS2 (pirita) + 3 1/2 O2 + H2O → Fe2+ + 2 SO4 2− + 2 H+
Reacción iniciadora
Lenta, espontánea (las bacterias catalizan)
Fe2+
O2
Rápida, espontánea (las bacterias pueden también catalizar)
Espontánea (las bacterias pueden también catalizar)
FeS2
Ciclo de propagación
Fe3+

Figura 19.36 Papel de las bacterias oxidadoras de hierro en la oxidación del mineral pirita.

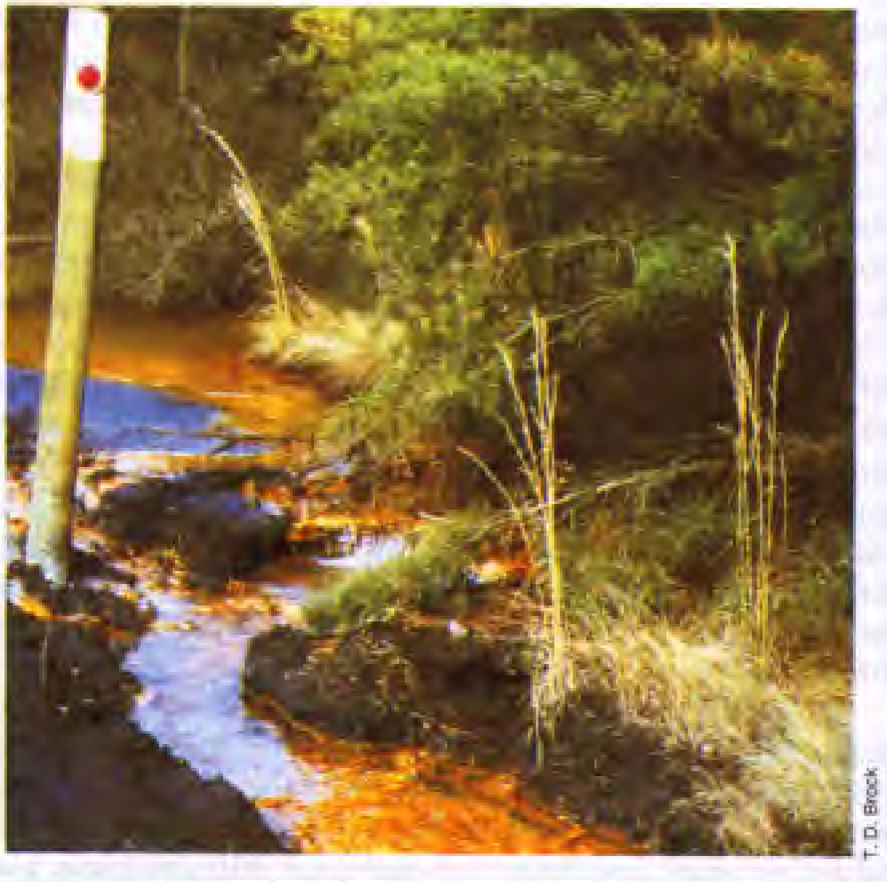
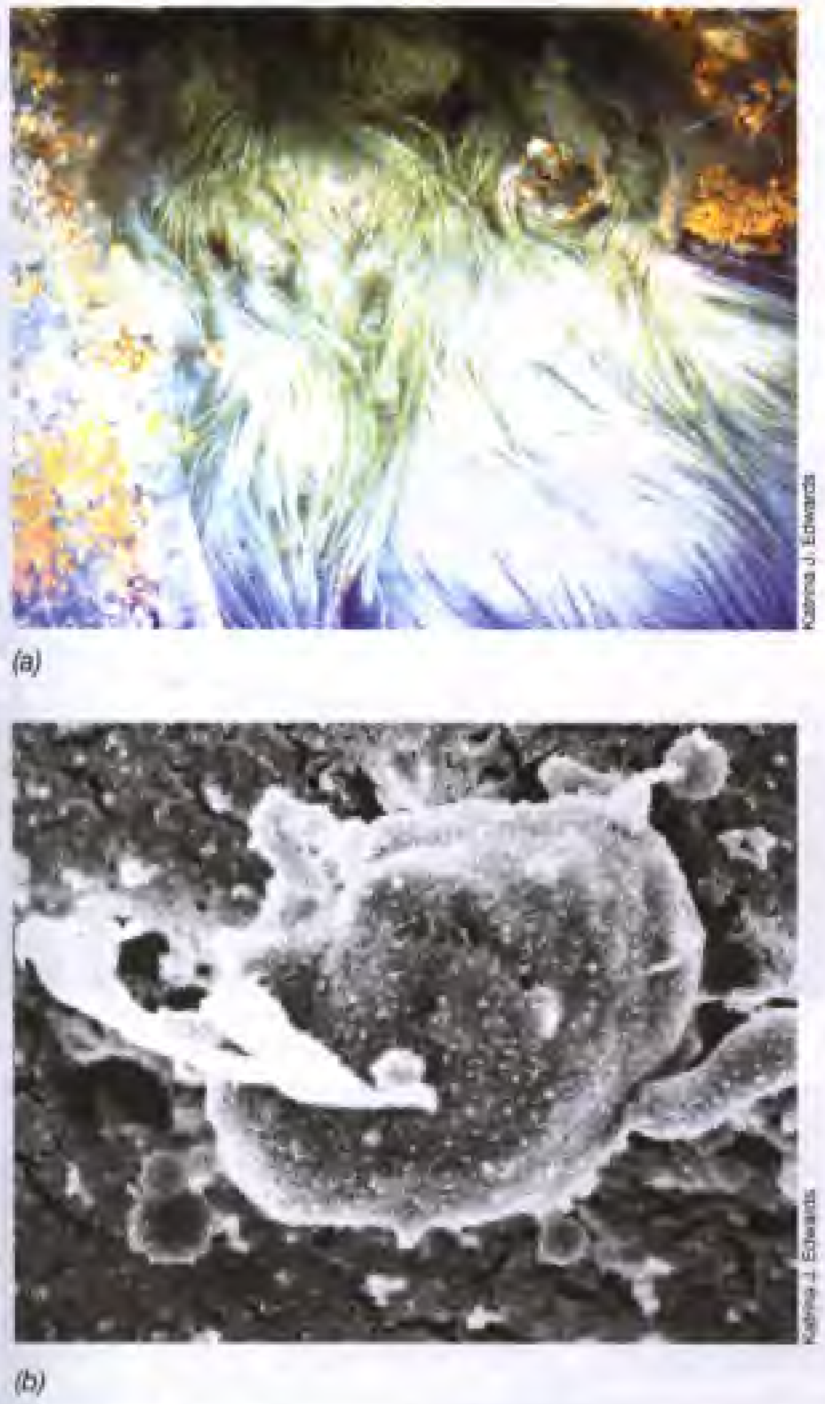


Figura 19.37 Drenaje ácido de una región de carbón bituminoso. Obsérvese el color rojo-amarillento, debido a la precipitación de óxidos de hierro (*véase* Figura 17.28*a*).

la pirita en los depósitos de mena de hierro (*véase* Figura 19.38). En Iron Mountain, en California (Figura 19.38), hay una zona bien estudiada de drenaje ácido de las minas donde el biofilme de *F. acidophilum* mantiene el pH próximo a 0. El biofilme está constantemente bañado por Fe^{2+} a concentraciones de hasta 30 g/l. A partir del Fe^{2+}, se genera ácido por las reacciones descritas previamente. *Ferroplasma* es una arquea carente de pared relacionada con *Thermoplasma* (*véanse* Figura 19.38*b* y Sección 13.5), en la morfología y la filogenia.

✓ 19.14 Revisión de conceptos

El hierro está presente en la naturaleza principalmente en dos estados de oxidación, ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}), y la transformación bacteriana y química de estos metales es de gran importancia ecológica y geológica. La reducción bacteriana de hierro férrico tiene lugar en ambientes anóxicos y ocasiona la movilización del hierro desde los pantanos, turberas y otros hábitat acuáticos ricos en hierro. La oxidación bacteriana de hierro ferroso sólo ocurre de forma significativa a pH bajo y es muy común en las regiones con minas de carbón, donde produce un tipo de contaminación llamado drenaje ácido.


Katrina J. Edwards

(a)

Katrina J. Edwards

(b)

Figura 19.38 *Ferroplasma acidophilum*, una arquea oxidadora de hierro extremadamente acidófila responsable de graves drenajes ácidos de las minas. (a) Células de *Ferroplasma* creciendo en la corriente de drenaje ácido (pH próximo a 0), en Iron Mountain, California. (b) Micrografía electrónica de una célula de *F. acidophilum* entre el material mineral.

- ✓ ¿Cuál es el estado de oxidación del hierro en el $Fe(OH)_3$?, ¿y en el FeS? ¿Cómo se forma el $Fe(OH)_3$?
- ✓ ¿Por qué la oxidación de Fe^{2+} en condiciones *óxicas* se produce principalmente a pH *ácido*?

VI BIORREMEDIO MICROBIANA

El potencial biogeoquímico colectivo de los microorganismos es enorme. De hecho, los microorganismos son los mejores químicos de la Tierra. Y como tales, han sido reclutados para ayudar a extraer metales valiosos de menas minerales (lixiviado microbiano) y a recuperar el ambiente (biorremedio). En las cuatro secciones siguientes vamos a examinar diversos procesos microbianos que o bien rinden productos de gran valor o bien biorremedian las actividades contaminantes de los humanos.

19.15 Lixiviado microbiano de menas minerales

Consideraremos aquí una situación en la cual la acidez y la solubilidad del metal que producen las bacterias acidófilas desempeñan una función beneficiosa en minería. El azufre, al combinarse con muchos metales, forma minerales muy insolubles y muchas de las menas de donde se extraen dichos metales son sulfuros. Si la concentración del metal en la mena es baja, es posible que no sea económicamente rentable concentrar el mineral por medios químicos convencionales. En esas condiciones se suele utilizar el **lixiviado microbiano**. Resulta especialmente útil en el caso del *cobre*, ya que el sulfato de cobre que se forma durante la oxidación de las menas del sulfuro de cobre es muy soluble en agua. De hecho, aproximadamente la cuarta parte del cobre de todo el mundo se obtiene por procesos de lixiviado.

Ya se ha dicho que el propio ion sulfuro, HS^-, se oxida espontáneamente en contacto con el aire. La mayoría de los sulfuros metálicos también se oxidan espontáneamente, pero a mucha menor velocidad que el sulfuro libre. Bacterias como *Thiobacillus ferrooxidans* pueden actuar de catalizadores y acelerar la tasa de oxidación de los minerales que contienen sulfuro, ayudando a solubilizar el metal (Figura 19.36). La Figura 19.39 muestra la tasa de oxidación relativa de un mineral de cobre en presencia y en ausencia de dicha bacteria. La susceptibilidad a la oxidación también presenta variaciones entre los minerales. Los que se oxidan más fácilmente se prestan más a la lixiviación. Por tanto, las menas de sulfuro de hierro y de sulfuro de cobre, como la pirotita (FeS) y la covelita (CuS), son lixiviadas fácil-

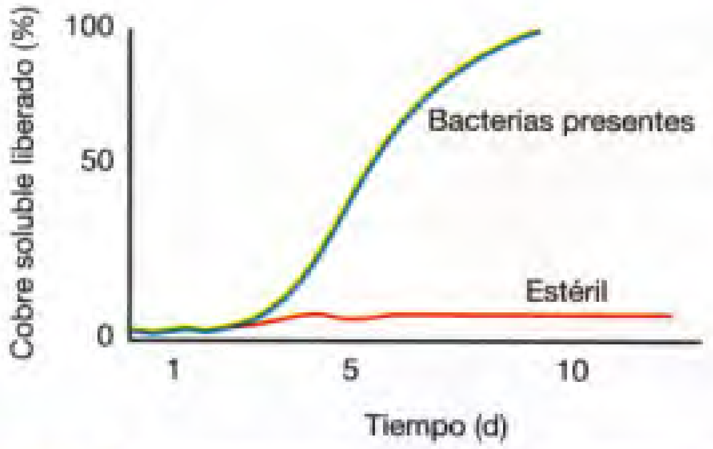


Figura 19.39 Efecto de la bacteria *Thiobacillus ferrooxidans* en la lixiviación del cobre a partir del mineral covelita (CuS). La lixiviación se realizó en una columna de laboratorio y la solución del lixiviado ácido contenía los nutrientes inorgánicos necesarios para el desarrollo de la bacteria. La actividad lixiviadora se siguió midiendo la cantidad de cobre soluble en la solución del fondo de la columna. La solución del lixiviado se hacía circular continuamente, manteniendo un sistema esencialmente cerrado.

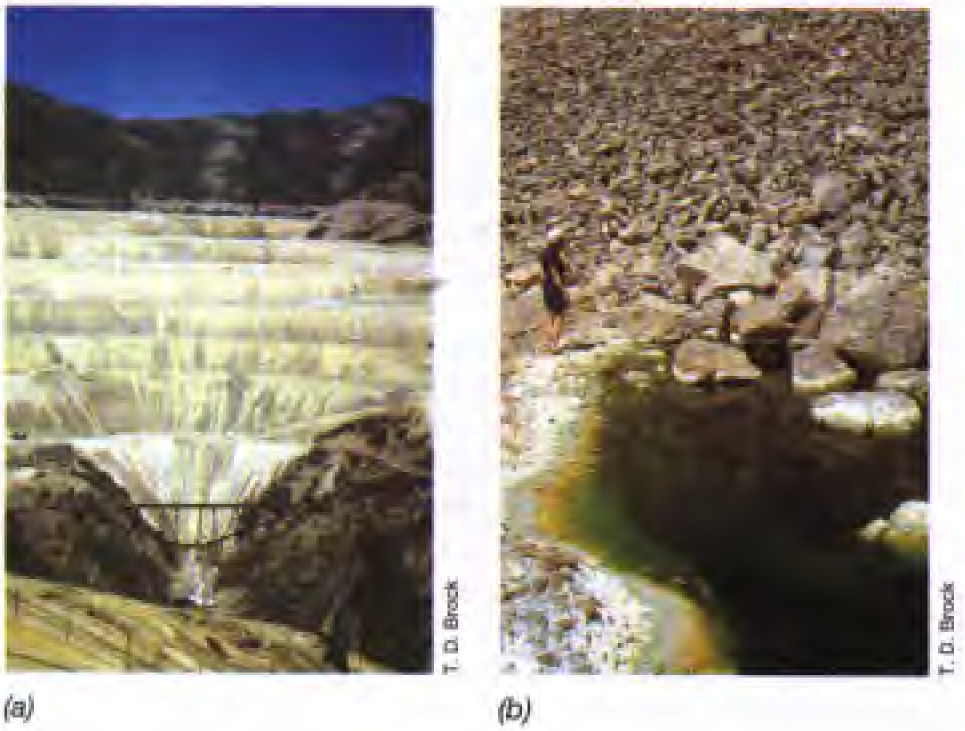
mente, mientras que las menas de plomo y de molibdeno lo son con mucha mayor dificultad.

El proceso de lixiviación

En el proceso de lixiviado microbiano, la mena de baja ley se amontona en una gran pila de lixiviado, a través de la cual se hace percolar una solución de ácido sulfúrico diluido (con un pH aproximado de 2) (Figura 19.40*a*). Se recoge el líquido que sale del fondo de la pila (Figura 19.40*b*), rico en mineral, y se transporta a una planta donde se precipita y purifica (Figura 19.40*c*). El líquido sobrante, al que se va añadiendo la cantidad de ácido necesaria para mantener el pH bajo, se vuelve a verter sobre la pila y el ciclo se repite.

Las bacterias pueden catalizar la oxidación de los sulfuros minerales mediante varios mecanismos. Tenemos un ejemplo en la oxidación de dos minerales de cobre, la calcocita, Cu_2S, en la que el cobre tiene valencia +1, y la covelita, CuS, en la cual tiene valencia +2. Como se ilustra en la Figura 19.41, *Thiobacillus ferrooxidans* es capaz de oxidar el Cu^+ de la calcocita (Cu_2S) a Cu^{2+}, eliminando parte del cobre que se encuentra en forma soluble, Cu^{2+}, y formando el mineral covelita (CuS). Hay que destacar que en esta reacción no se produce ningún cambio de valencia en el ion sulfuro y que las bacterias utilizan como fuente de energía la reacción de Cu^+ a Cu^{2+}. Es un proceso análogo a la oxidación, por la misma bacteria, del hierro ferroso a férrico. La covelita puede ser oxidada después, produciéndose sulfato y Cu^{2+} soluble (Figura 19.41).

En un segundo mecanismo, probablemente el más importante en la mayoría de las actividades mineras, se produce una *oxidación* química de la mena de cobre, con iones *férricos* formados a partir de la oxidación de los iones ferrosos (Figura 19.41). La pirita está presente en casi todas las menas y su oxidación lleva a la formación de hierro fé-



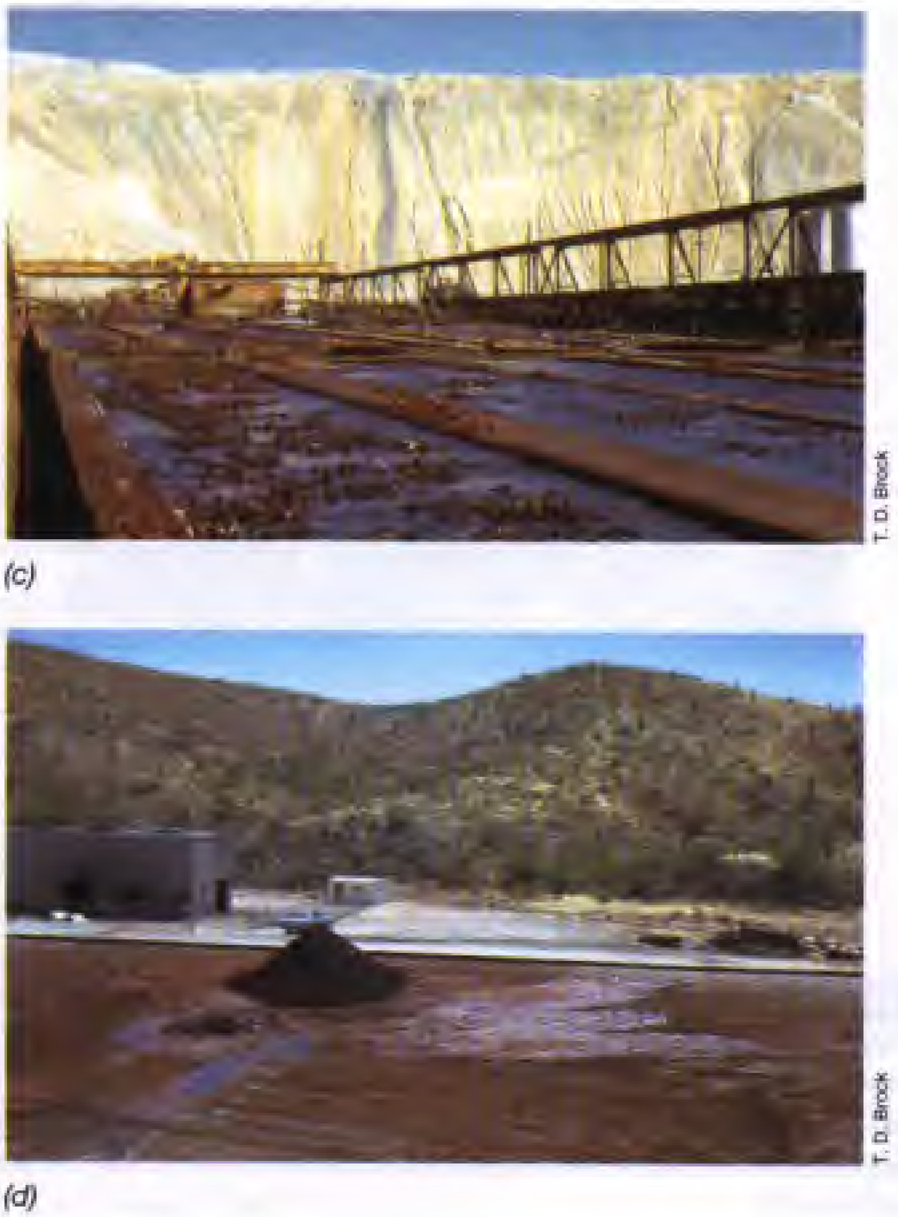


Figura 19.40 Empleo de bacterias en la lixiviación de mineral de cobre de bajo contenido en el metal. (a) Formación típica de lixiviación. La mena de bajo contenido ha sido amontonada en una gran pila. Las cañerías distribuyen sobre la superficie el agua ácida, que se filtra lentamente a través de la pila y sale por abajo. (b) Efluente de una formación de lixiviación de cobre. El agua ácida es muy rica en cobre disuelto. (c) Recuperación de cobre disuelto por el paso del agua rica en cobre sobre el hierro metálico en un canal. (d) Pequeña pila de metal de cobre recuperado y retirado del canal, listo para una posterior purificación.

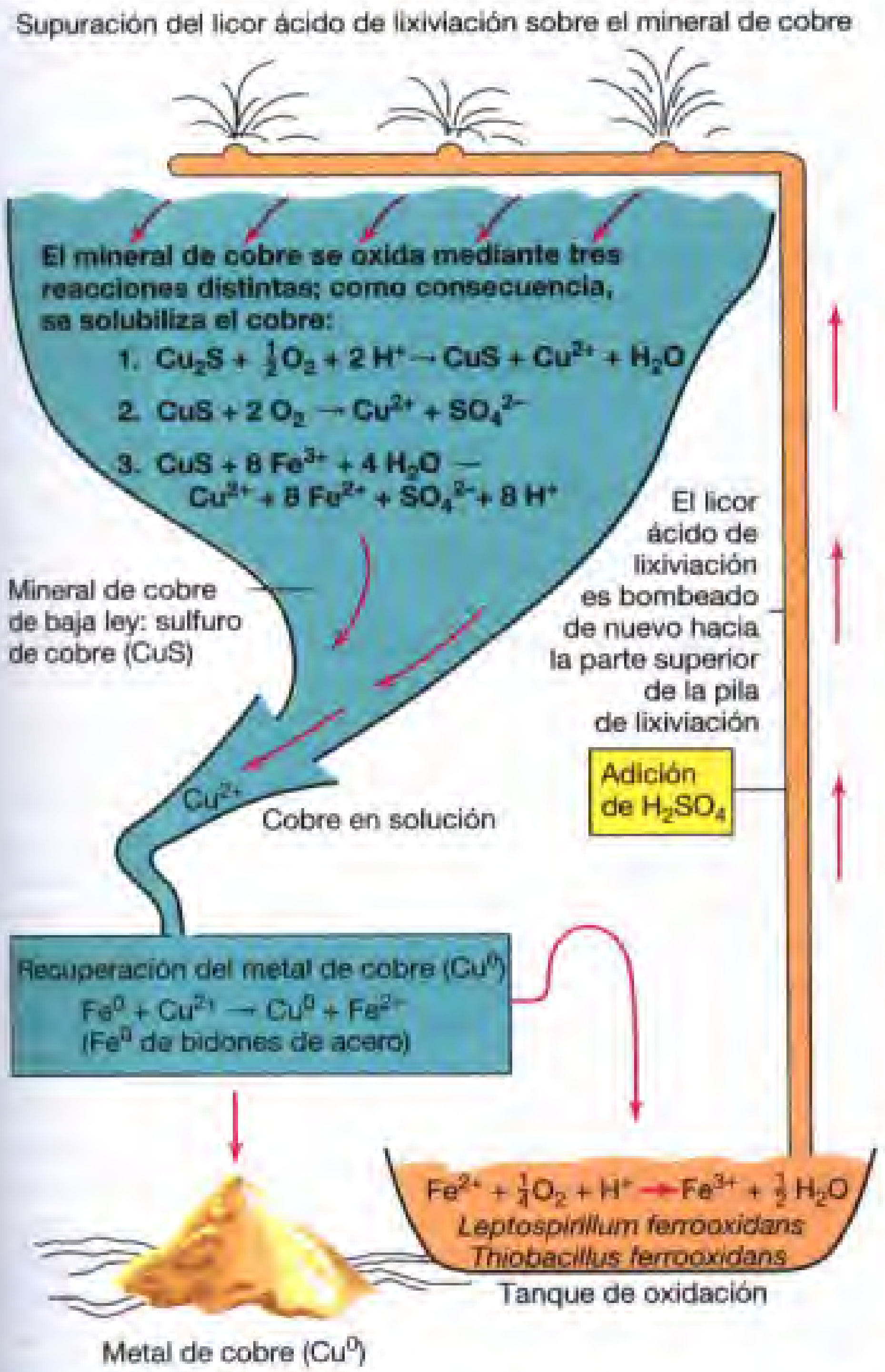

Supuración del licor ácido de lixiviación sobre el mineral de cobre
El mineral de cobre se oxida mediante tres reacciones distintas; como consecuencia, se solubiliza el cobre:
1. $Cu_2S + \frac{1}{2}O_2 + 2\,H^+ \rightarrow CuS + Cu^{2+} + H_2O$
2. $CuS + 2\,O_2 \rightarrow Cu^{2+} + SO_4^{2-}$
3. $CuS + 8\,Fe^{3+} + 4\,H_2O \rightarrow Cu^{2+} + 8\,Fe^{2+} + SO_4^{2-} + 8\,H^+$
El licor ácido de lixiviación es bombeado de nuevo hacia la parte superior de la pila de lixiviación
Mineral de cobre de baja ley: sulfuro de cobre (CuS)
Adición de H_2SO_4
Cu^{2+}
Cobre en solución
Recuperación del metal de cobre (Cu^0)
$Fe^0 + Cu^{2+} \rightarrow Cu^0 + Fe^{2+}$
(Fe^0 de bidones de acero)
$Fe^{2+} + \frac{1}{4}O_2 + H^+ \rightarrow Fe^{3+} + \frac{1}{2}H_2O$
Leptospirillum ferrooxidans
Thiobacillus ferrooxidans
Tanque de oxidación
Metal de cobre (Cu^0)

Figura 19.41 Distribución de una pila de lixiviación y reacciones que intervienen en la lixiviación microbiana de minerales de sulfuro de cobre para producir Cu^0 (cobre metálico). La reacción 1 es principalmente biológica (bacteriana), mientras que la 2 es, a la vez, biológica y química. La reacción 3 es estrictamente química y, posiblemente, la más importante en el proceso de lixiviación del cobre. Para que la Reacción 3 siga adelante es esencial que el Fe^{2+} (de la oxidación de sulfuro en CuS a sulfato) sea (re)oxidada a Fe^{3+} por *Thiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* (parte inferior del dibujo).

rrico. Éste es un aceptor de electrones muy bueno de los minerales que contienen sulfuros y la reacción del CuS con el hierro férrico origina la solubilización del cobre y la formación de hierro ferroso. En presencia de O_2, y con pH ácido, *Thiobacillus ferrooxidans* vuelve a oxidar el hierro ferroso a su forma férrica y este hierro férrico puede oxidar más sulfuro de cobre. Por tanto, el proceso se mantiene funcionando mediante la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} que realiza la bacteria.

Recuperación del metal

Otra fuente de hierro en las operaciones de lixiviado es en la planta de precipitado que se usa para recuperar el cobre soluble a partir de la solución de lixiviado (Figura 19.40*c* y *d*). Se utiliza chatarra de hierro, Fe^0, para recuperar cobre del líquido de lixiviado mediante la reacción que se indica en la parte inferior de la Figura 19.41, la cual produce una cantidad considerable de Fe^{2+}. En la mayor parte de las operaciones de lixiviación, el líquido rico en Fe^{2+} que queda después de la extracción del cobre es conducido hasta un estanque de oxidación, donde *Thiobacillus ferrooxidans* prolifera y forma Fe^{3+}. Se añade ácido al estanque para mantener el pH bajo y conservar así el Fe^{3+} en solución. Este líquido rico en ion férrico se bombea hacia la parte superior de la pila, quedando disponible el ion férrico para oxidar más mineral con sulfuro.

El enorme tamaño de las pilas de lixiviado de cobre hace que penetre poco oxígeno en ellas, por lo que normalmente el interior se hace anóxico. Aunque la mayoría de las reacciones indicadas en la Figura 19.41 requieren oxígeno molecular, las reacciones de oxidación pueden realizarse de forma anaeróbica, porque *Thiobacillus ferrooxidans* puede usar Fe^{3+} como *aceptor* de electrones en ausencia de oxígeno. Las grandes cantidades de Fe^{3+} que se añaden a la solución de lixiviado procedentes de hierro oxidado de la chatarra llevan adelante el proceso, incluso bajo condiciones anóxicas. La temperatura elevada puede constituir un problema en las operaciones de lixiviación. *T. ferrooxidans* es mesófila, pero la temperatura en el interior de la carga de lixiviado a menudo aumenta de manera espontánea como resultado de la actividad microbiana. De esta forma, los quimiolitotrofos oxidadores de hierro termófilos tales como las especies termófilas de *Thiobacillus* y *Leptospirillum ferrooxidans* y, a temperaturas superiores (60-80°C), la arquea acidófila *Sulfolobus* (*véase* Sección 13.9) pueden ser importantes en el lixiviado de la mena por encima de los 40°C.

Otros procesos de lixiviado: uranio y oro

Los microorganismos también se utilizan en el lixiviado de menas que contengan oro o uranio. Aunque *T. ferrooxidans* puede oxidar U^{4+} a U^{6+} con O_2 como aceptor de electrones, es posible que el proceso de lixiviado de uranio dependa de la oxidación química del uranio por Fe^{3+}, en la que *T. ferrooxidans* participa a través de la reoxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+}, como se describe en el lixiviado de la mena de cobre (*véase* Figura 19.41). La reacción observada es:

$$\underset{(U^{4+})}{UO_2} + \underset{(Fe^{3+})}{Fe_2(SO_4)_3} \rightarrow \underset{(U^{6+})}{UO_2SO_4} + \underset{(Fe^{2+})}{2\,FeSO_4}$$

A diferencia del UO_2, el uranio oxidado es soluble y puede recuperarse por otros procesos.

En la naturaleza, el oro aparece frecuentemente asociado con minerales que contienen arsénico y pirita. En el lixiviado microbiano del oro, *T. ferrooxidans* y otros microorganismos relacionados se utilizan para atacar y solubilizar el mineral de arsenopirita y en el proceso se libera el oro atrapado (Au).

$$2\,FeAsS\,[Au] + 7\,O_2 + 2\,H_2O + H_2SO_4 \rightarrow Fe_2(SO_4)_3 + 2\,H_3AsO_4 + [Au]$$

El oro es después acomplejado con cianuro por métodos tradicionales en la minería del oro. A diferencia del cobre, en el que el lixiviado da lugar a una gran pila de lavado (*véase* Figura 19.40), con el oro se realiza en *biorreactores* relativamente pequeños (*véase* Figura 19.42); el biolixiviado efectuado de esta forma libera más del 95% del oro atrapado. Y, aunque el arsénico y el cianuro son residuos tóxicos del proceso minero, ambos se eliminan en el biorreactor donde tiene lugar el proceso; el arsénico como un precipitado férrico y el cianuro (CN^-) mediante oxidación microbiana a CO_2 y urea en fases posteriores del proceso. El lixiviado microbiano del oro a pequeña escala como alternativa a los métodos a gran escala se está haciendo cada vez más frecuente y está sustituyendo a los procedimientos convencionales tan costosos y perjudiciales para el ambiente.

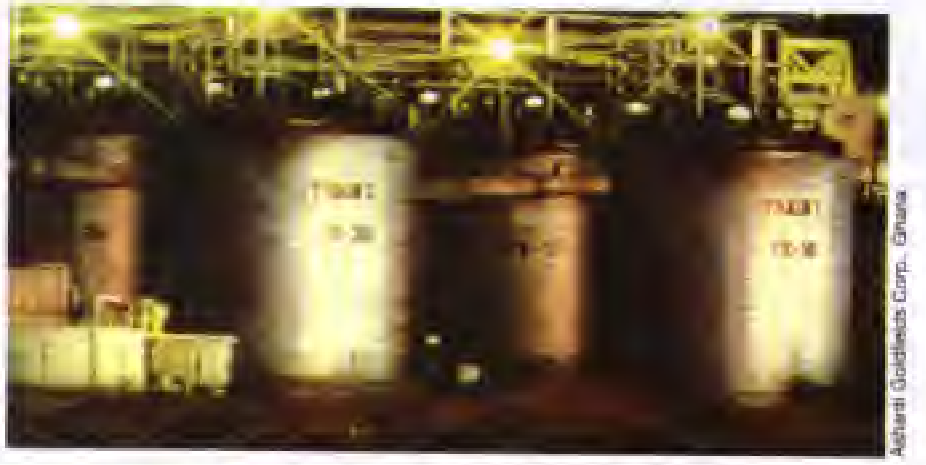
✓ 19.15 Revisión de conceptos

La oxidación del mineral de cobre por las bacterias conduce a la solubilización del cobre, un proceso conocido como *lixiviado microbiano*. El lixiviado es importante en la recuperación del cobre y del uranio a partir minerales con bajo contenido en metal. La oxidación bacteriana del hierro de la pirita (mineral de sulfuro de hierro) es también una parte importante del proceso de lixiviado microbiano porque el hierro férrico producido es, por sí mismo, un oxidante de los minerales.

- ✓ ¿Cómo se oxida el CuS bajo condiciones *anóxicas*?
- ✓ ¿Por qué es importante mantener ácido el líquido de lavado en el proceso de lavado del mineral de cobre?
- ✓ Desde el punto de vista de la oxidación de metal, ¿en qué se diferencia el proceso de lixiviado del cobre respecto al del oro?

19.16 Transformación del mercurio y de otros metales pesados

Los oligoelementos o *metales traza* son elementos que están presentes a bajas concentraciones en las rocas, suelos, aguas y en la atmósfera. Algunos de ellos (por ejemplo, el cobalto, el cobre, el zinc, el níquel o el molibdeno) son nutrientes (*véase* Sección 5.1), pero varios de ellos, cuando se encuentran a concentraciones elevadas, resultan tóxicos para los seres vivos. Algunos de esos elementos tóxicos son suficientemente volátiles para que su transporte atmosférico sea significativo y pueden ser, por tanto, un peligro para el ambiente. Entre ellos se encuentran el mercurio, el plomo, el arsénico, el cadmio y el selenio. Muchos de esos oligoelementos llevan a cabo reacciones de oxidorreducción catalizadas por microorganismos, y algunos también pueden encontrarse formando compuestos orgánicos procedentes de la acción microbiana. Nos centraremos en el estudio de la biogeoquímica del *mercurio*, debido a su importancia como contaminante ambiental y a la participación de los microorganismos en dicho ciclo.



Ashanti Goldfields Corp., Ghana

Figura 19.42 Fotografía de tanques de lixiviación del oro en los campos de oro de Ashanti en Ghana, África. Dentro de los tanques hay una mezcla de *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* que solubiliza el mineral de pirita/arsénico que contiene oro incrustado. Se libera el oro. *Véase* el texto para una explicación de las reacciones que intervienen.

Ciclo global del mercurio y del metilmercurio

Aunque el mercurio se encuentra en concentraciones muy bajas en la mayoría de los medios naturales, alrededor de 1 nanogramo (ng) por litro, es un producto industrial muy utilizado y es el componente activo de muchos plaguicidas. Debido a su capacidad de acumulación en los tejidos vivos (algo poco frecuente en otros elementos), y a su alta toxicidad, el mercurio tiene una gran importancia desde el punto de vista ambiental. La explotación de los yacimientos de mercurio y la incineración de combustibles fósiles liberan al ambiente unas 40 000 *toneladas* anuales de mercurio; y una cantidad aún mayor se libera por procesos biogeoquímicos. El mercurio es también otro producto secundario de la industria electrónica, especialmente la fabricación de pilas y cables, de la industria química y de la incineración de residuos urbanos.

El mercurio elemental (Hg^0) es la forma principal en la que se encuentra este elemento en la atmósfera. Es volátil, y se oxida fotoquímicamente a ion mercurio (Hg^{2+}); la mayor parte del mercurio que penetra en los ambientes acuáticos lo hace en la forma Hg^{2+} (Figura 19.43). El ion mercurio se adsorbe fácilmente a la materia particulada, a partir de la cual puede ser metabolizado por los microorganismos. La principal reacción microbiana que se ha observado es la *metilación* del mercurio, que produce metilmercurio, (CH_3Hg^+) (*véase* Figura 19.43). Metabólicamente, la metilación del mercurio se efectúa por la donación de grupos metil-B_{12}. El metilmercurio es especialmente tóxico porque se absorbe a través de la piel. Pero, además, es soluble, por lo que puede concentrarse a través de la cadena alimentaria acuática, principalmente en peces, o ser metilado otra vez por los microorganismos, produciendo el compuesto volátil dimetilmercurio, $CH_3—Hg—CH_3$.

Tanto el metilmercurio como el dimetilmercurio tienden a acumularse en los tejidos animales, especialmente en los músculos. El metilmercurio es unas cien veces más tóxico que el Hg^0 o el Hg^{2+} y se concentra en los peces, en los cuales actúa como una potente neurotoxina. Por tanto, este compuesto es una toxina ambiental importante; su acumulación parece ser un problema considerable en algunos lagos, en los que se ha observado un aumento creciente de las concentraciones de este elemento en peces destinados al consumo humano. También puede dañar el hígado y el riñón de los humanos y de otros animales.

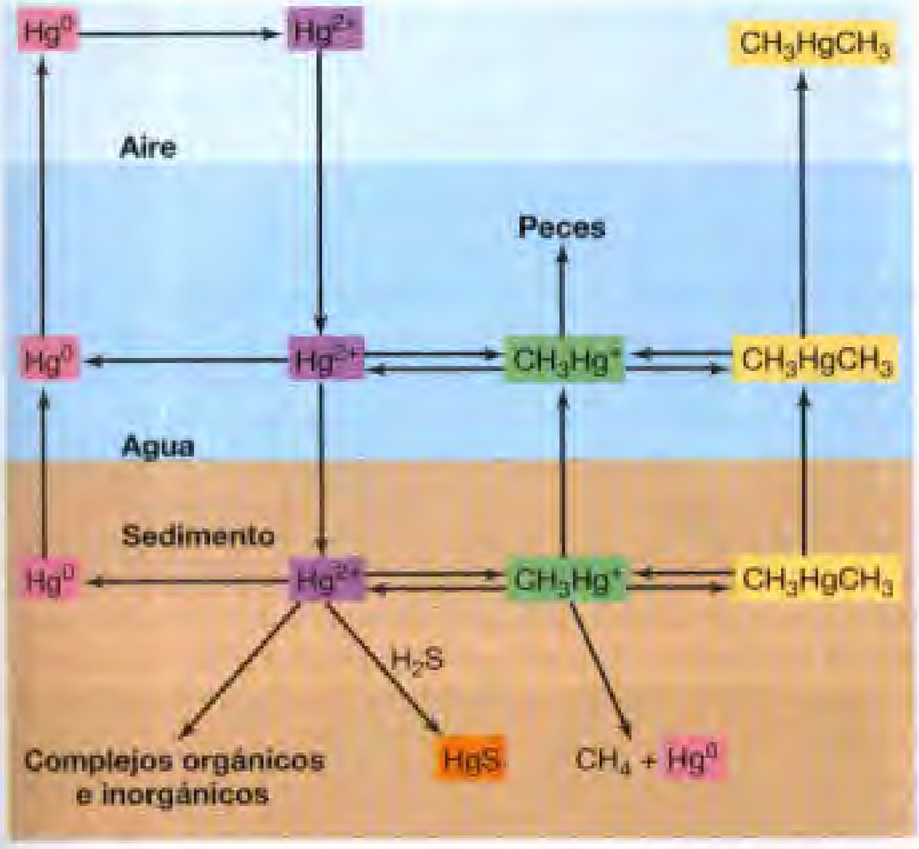


Figura 19.43 Ciclo biogeoquímico del mercurio. Los principales reservorios de mercurio son el agua y los sedimentos, a partir de donde pueden concentrarse en los tejidos animales o precipitarse en forma de HgS. Las diversas formas de mercurio que se encuentran normalmente en los medios acuáticos se indican con diferente color.

A escala global, se producen varias transformaciones más del mercurio, que incluyen reacciones en las que intervienen bacterias reductoras de sulfato ($H_2S + Hg^{2+} \rightarrow HgS$) y bacterias metanogénicas ($CH_3Hg^+ \rightarrow CH_4 + Hg^0$) (*véase* Figura 19.43). La solubilidad del HgS es muy baja, por lo que en sedimentos anóxicos sulfato reductores la mayor parte del mercurio se encuentra en esa forma. En cambio, si existe aireación, el HgS puede ser oxidado, principalmente por los tiobacilos, produciéndose Hg^{2+} y finalmente metilmercurio.

Resistencia al mercurio

A concentraciones suficientemente altas, el mercurio bivalente (Hg^{2+}) y el metilmercurio (CH_3Hg^+) pueden ser tóxicos, tanto para los organismos superiores como para los microorganismos. Por fortuna, algunas bacterias llevan a cabo la biotransformación de formas tóxicas de mercurio a formas no tóxicas. En bacterias Gram negativas resistentes al mercurio, una enzima unida a NADPH, llamada *reductasa mercúrica*, transfiere dos electrones al Hg^{2+}, reduciéndolo a Hg^0. El Hg^0 producido en esta reacción es volátil, pero lo esencial es que no es tóxico para los humanos ni para los microorganismos, en comparación con el Hg^{2+} o el CH_3Hg^+. La conversión bacteriana de Hg^{2+} a Hg^0 permite entonces convertir más CH_3Hg^+ en Hg^{2+}.

La resistencia al mercurio se ha estudiado intensamente en *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria Gram negativa que posee un plásmido que contiene genes para la resistencia a dicho metal. Esos genes, llamados genes *mer*, están situados en un operón y están bajo el control de la proteína reguladora MerR (el producto de *merR*) (Figura 19.44*a*). Curiosamente, MerR funciona de represor y también de activador (*véase* Capítulo 8). En ausencia de Hg^{2+}, MerR se une a la región operadora del operón *mer* y realiza la transcripción de genes *merTPCAD* (Figura 19.44*a*). Sin embargo, cuando Hg^{2+} está presente, el metal forma un complejo con MerR, que funciona entonces como *activador* de la transcripción del operón *mer*. La reductasa mercúrica, mencionada previamente, es producto del gen *merA*. MerD, producto del gen *merD*, también cumple una función reguladora, mientras que *merP* codifica una proteína periplasmática captadora de Hg^{2+} (Figura 19.44*b*). Esta proteína, MerP, se une al Hg^{2+} y lo transfiere a una proteína de membrana MerT (el producto de *merT*), que transporta el Hg^{2+} al interior de la célula para que sea reducido por la reductasa mercúrica (Figura 19.44*b*). El resultado final es la reducción de Hg^{2+} a Hg^0, que es volátil y es liberado por la célula (Figura 19.44*b*). Se han encontrado genes *mer* adicionales en otros organismos, pero los que se describen aquí parecen conservarse en todos los operones *mer* examinados.

Resistencia a otros metales pesados

Se ha observado que plásmidos (*véase* Sección 10.8) aislados de microorganismos Gram positivos y Gram negativos del dominio *Bacteria* codifican algún tipo de resistencia a metales pesados. Ciertos plásmidos que confieren resistencia a antibióticos también tienen genes para la resistencia al mercurio y al arsénico. Otros plásmidos codifican sólo la

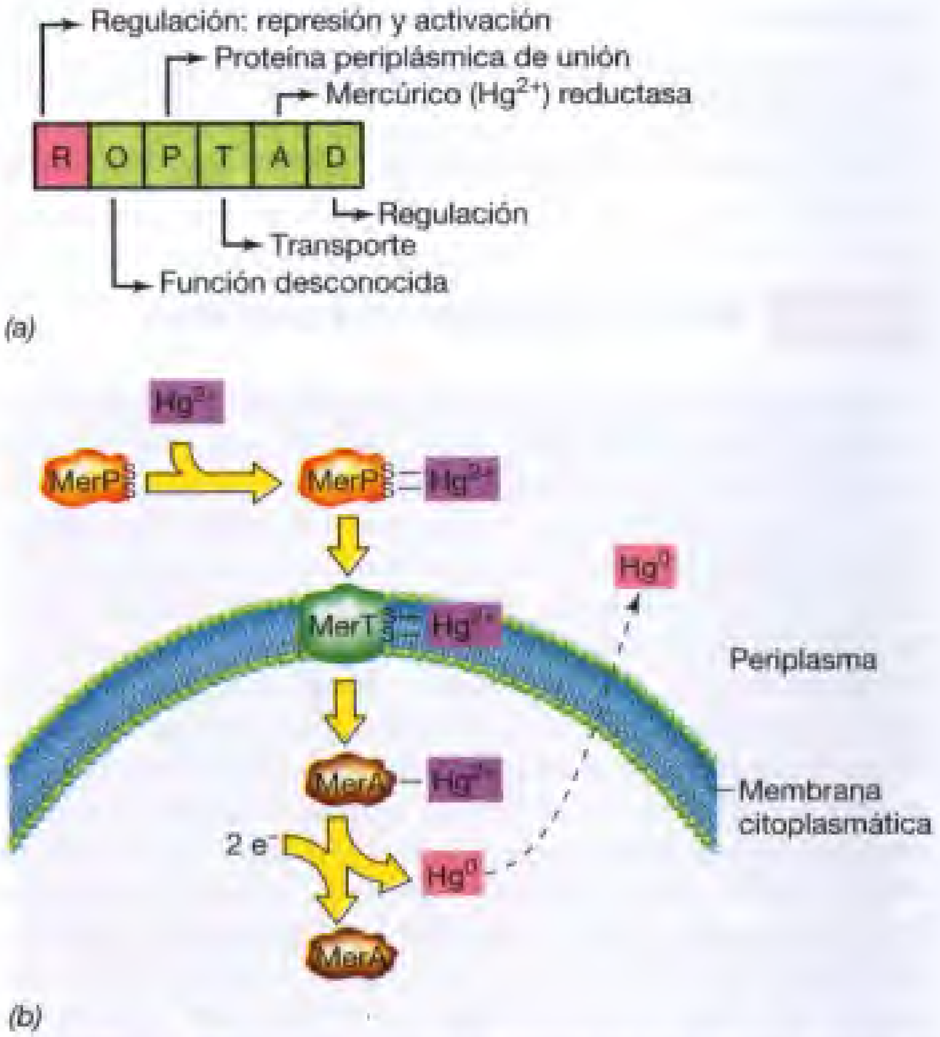


Figura 19.44 Mecanismo de reducción de Hg^{2+} a Hg^0 por *Pseudomonas aeruginosa*. (a) El operón *mer*. MerR puede funcionar bien como represor (en ausencia de Hg^{2+}), bien como activador transcripcional (en presencia de Hg^{2+}). (b) Transporte y reducción de Hg^{2+}. El Hg^{2+} se une a los residuos de cisteína en ambas proteínas MerP y MerT.

resistencia a metales pesados. En un plásmido de gran tamaño aislado de *Staphylococcus aureus* se ha detectado resistencia al mercurio, al cadmio, al arsenato y al arsenito. El mecanismo de resistencia varía para cada metal en concreto. Por ejemplo, la resistencia al arsenato y al cadmio se deben a la acción de enzimas que expulsan inmediatamente todos los iones de arsenato o cadmio incorporados, evitando así que los metales desnaturalicen las proteínas.

Estudios realizados en bacterias resistentes a níquel y a cobalto demuestran que en la mayoría de los casos los genes de resistencia se encuentran en plásmidos; es típico que haya resistencia a ambos metales en un mismo plásmido. Estudios realizados en cultivos de enriquecimiento demuestran que las bacterias resistentes al níquel son poco frecuentes en los suelos y en otros ambientes en los que este metal no se encuentra en cantidades significativas. Las bacterias muy resistentes al níquel o a otros metales son más frecuentes en aguas residuales de la industria de procesamiento de metales, o en instalaciones mineras donde los metales pesados son extraídos por lixiviado junto con minerales de hierro o cobre.

✓ 19.16 Revisión de conceptos

La principal forma tóxica del mercurio es el metilmercurio. Éste puede dar lugar a Hg^{2+}, que es reducido por las bacterias a Hg^0. Con frecuencia, la capacidad de las bacterias para resistir la toxicidad de los metales pesados se debe a la presencia de plásmidos específicos, que codifican enzimas capaces de detoxificar los metales.

✓ ¿Cuáles son las formas de mercurio más tóxicas para los organismos?

✓ ¿Cómo llevan a cabo las bacterias la detoxificación del mercurio?

19.17 Biodegradación del petróleo

La descomposición microbiana del petróleo y de sus derivados es de considerable importancia económica y ambiental. El petróleo es una rica fuente de materia orgánica y los hidrocarburos que contiene son rápidamente atacables por diferentes microorganismos en condiciones aeróbicas. No resulta extraño, por tanto, que en contacto con el aire y la humedad sea atacado por los microorganismos. En determinadas circunstancias, como el almacenado en grandes tanques, el crecimiento microbiano no es deseable. Sin embargo, en otras situaciones, como cuando se produce algún vertido de petróleo, su utilización por los microorganismos es deseable, e incluso, puede ser estimulada añadiéndole nutrientes inorgánicos. El término *biorremedio* hace referencia a la eliminación del petróleo o de otros contaminantes mediante el uso de microorganismos. La importancia del biorremedio para eliminar los vertidos de petróleo ha sido ampliamente demostrada en los últimos años en varios casos en que se produjeron vertidos considerables de crudo al mar (*véase* Figura 19.46).

La bioquímica de la degradación de petróleo se ha estudiado en la Sección 17.23, donde se ha destacado la importancia de la función que desempeñan las enzimas oxigenasa en la introducción de átomos de oxígeno en el hidrocarburo, lo que permite (*véase* Figura 17.55) que haya posteriores procesos bioquímicos. Aquí nos centraremos en los procesos aeróbicos donde la actividad de esas enzimas es relevante y donde la oxidación de hidrocarburos en la naturaleza es cuantitativamente más significativa.

Descomposición de los hidrocarburos

Se ha demostrado que una gran variedad de bacterias (incluyendo algunas cianobacterias), diversos mohos y levaduras, así como determinadas algas verdes pueden oxidar hidrocarburos aeróbicamente. Es muy frecuente la contaminación a pequeña escala por petróleo en ecosistemas acuáticos y terrestres debido tanto a actividades humanas como a causas naturales. Existen diversas comunidades microbianas capaces de utilizar hidrocarburos como donadores de electrones. El metano, el hidrocarburo más sencillo, es degradado por un grupo especializado de bacterias, las bacterias *metanotróficas* (*véanse* Secciones 12.6 y 17.24); pero estos microorganismos no pueden crecer con hidrocarburos de mayor número de carbonos.

Los microorganismos oxidadores de hidrocarburos crecen rápidamente sobre la superficie del petróleo y la actividad es más extensa si las condiciones ambientales como temperatura y nutrientes inorgánicos (principalmente N y P) son las adecuadas (*véase* Figura 19.46). Dado que el petróleo es insoluble en agua y menos denso, flota y forma manchas en su superficie. Las bacterias oxidadoras de hidrocarburos pueden atacar las gotículas insolubles de petróleo y a menudo pueden verse en grandes cantidades sobre ellas (Figura 19.45). La acción de dichas bacterias lleva a la descomposición del petróleo y a la dispersión de la mancha.

En la eliminación de vertidos de petróleo, los microorganismos actúan oxidando el petróleo a CO_2 (Figura 19.46). Cuando se producen grandes vertidos, las fracciones de hidrocarburos volátiles se evaporan rápidamente, quedando los componentes aromáticos y alifáticos de cadena larga para que sean eliminados por los organismos. En los vertidos en los que se han llevado a cabo estudios se ha visto que las bacterias oxidadoras de hidrocarburos han aumentado su número de 10^3-10^6 veces poco tiempo después de producirse el vertido.

En experimentos llevados a cabo con hidrocarburos con radioisótopos como trazadores, o mediante el consumo de

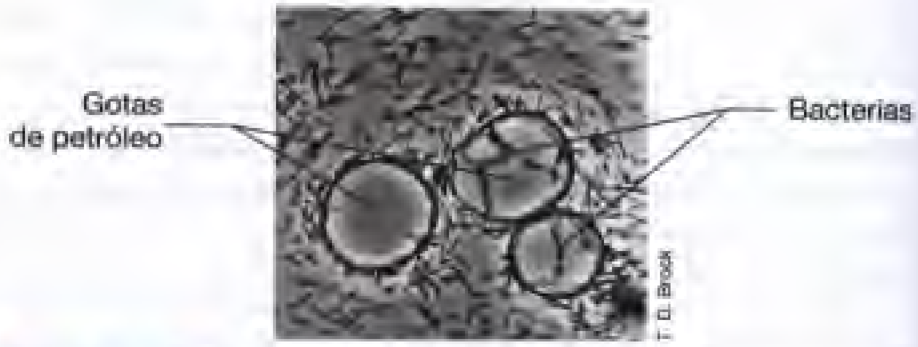
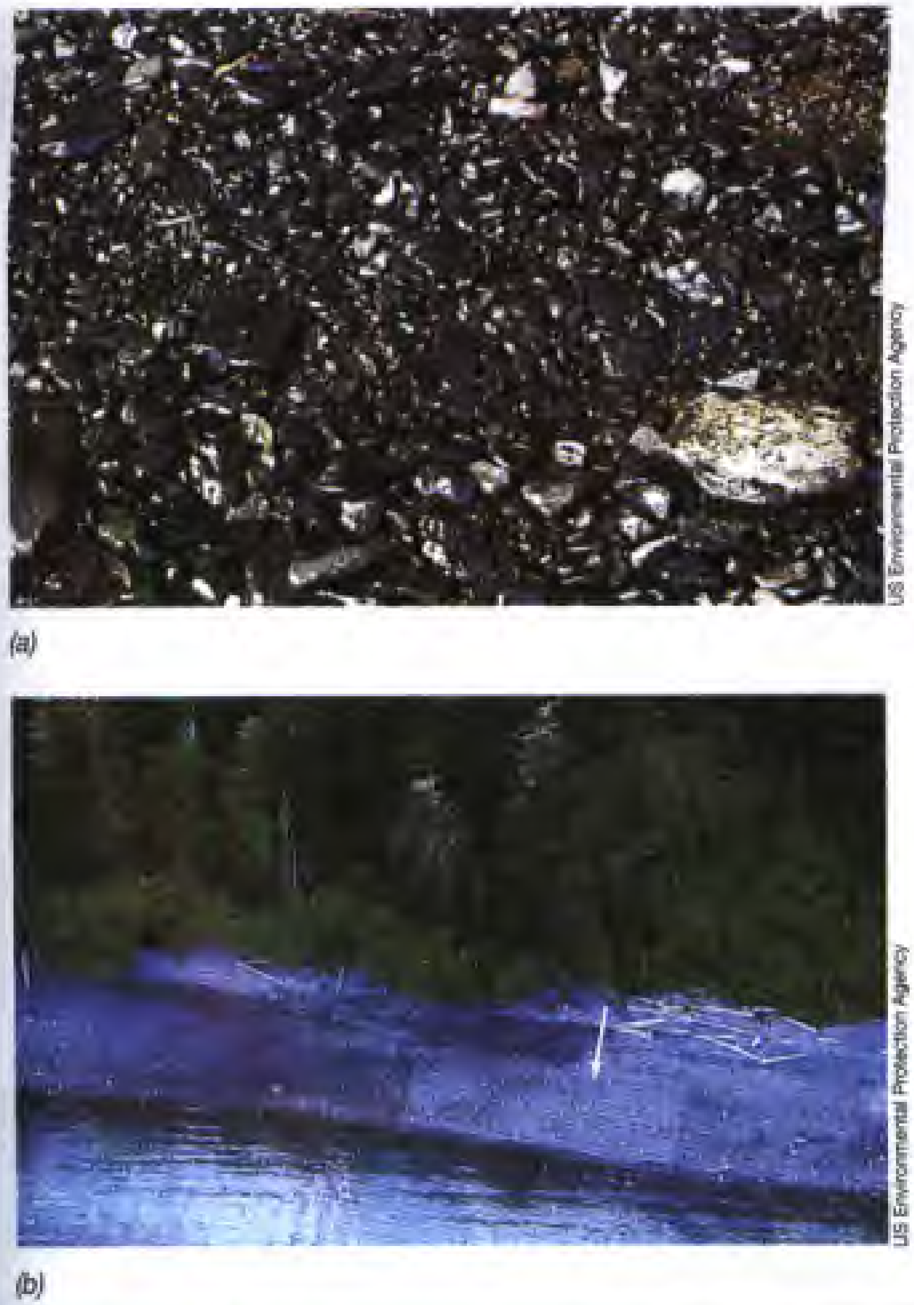


Figura 19.45 Bacterias oxidadoras de hidrocarburos asociadas con gotas de petróleo. Las bacterias se concentran en grandes cantidades en la interfase petróleo-agua, pero no penetran en el interior de las gotas.



US Environmental Protection Agency

US Environmental Protection Agency

Figura 19.46 Consecuencias ambientales de extensos vertidos de petróleo en ambientes marinos y efecto de la biorremediación. (a) Una playa contaminada a lo largo de la costa de Alaska por el vertido del petrolero *Valdez* de la compañía Exxon, en 1989. (b) La zona rectangular del centro (flecha) fue tratada con nutrientes inorgánicos para estimular la biorremediación mediante microorganismos del petróleo, mientras que las áreas de izquierda y derecha no fueron tratadas.

Standard Oil Company

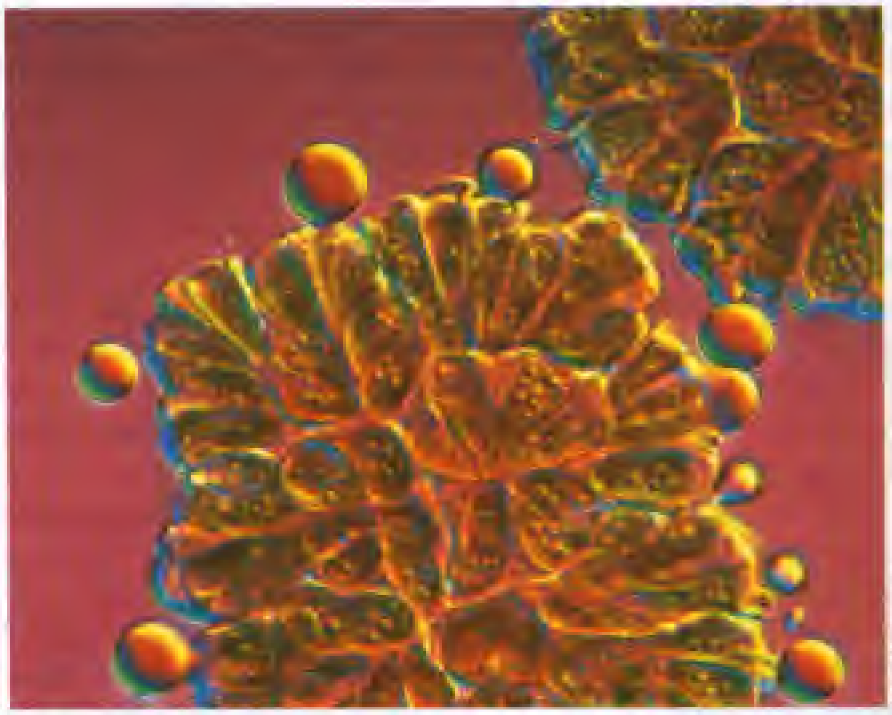
Figura 19.47 Conjunto de tanques de almacenamiento de combustible en los que puede producirse crecimiento microbiano masivo en las interfases petróleo-agua.

O_2 para medir la actividad heterotrófica, se ha visto que, en condiciones ideales, hasta un 80% de los componentes no volátiles son oxidados por bacterias al año de producirse el vertido. Sin embargo, determinadas fracciones, como los hidrocarburos con cadenas ramificadas y los hidrocarburos policíclicos, permanecen en el ambiente por más tiempo. El petróleo que alcanza los sedimentos es degradado muy lentamente, y puede causar un impacto significativo a largo plazo en la pesca y en otras actividades cuyo alto rendimiento depende de aguas no contaminadas.

Las **interfases** entre petróleo y agua son frecuentes. Es casi imposible evitar la acumulación de humedad en los tanques de petróleo, donde se forma una capa de agua por debajo del combustible. Los tanques de almacenamiento de gasolina y petróleo (Figura 19.47) son hábitat potenciales para los microorganismos oxidadores de hidrocarburos, que pueden acumularse y desarrollarse en la interfase petróleo-agua. Si el agua tiene suficiente sulfato crecen las bacterias sulfato reductoras, consumiendo hidrocarburos en condiciones totalmente anóxicas (*véase* Sección 17.23). El sulfuro (H_2S) que se produce es muy corrosivo y puede agujerear los tanques.

Producción de petróleo

Aunque, como hemos visto, en la degradación del petróleo los microorganismos pueden desempeñar un papel muy importante, algunos microorganismos también pueden llevar a cabo la *producción* de hidrocarburos, particularmente las algas verdes. Por ejemplo, en el alga colonial *Botryococcus braunii*, el crecimiento va acompañado de la secreción de hidrocarburos de cadena larga (C_{30}-C_{36}), que tienen la consistencia del petróleo (Figura 19.48). En *B. braunii*, aproximadamente el 30% del peso seco celular es petróleo. Existe un interés creciente en utilizar ésta y otras algas que produzcan petróleo como fuente renovable de este producto. Hay evidencias de que ciertos tipos de petróleo se originaron de forma similar a *B. braunii*, que crecían en el fondo de lagos en tiempos antiguos.



Arthur Nonomura

Figura 19.48 Micrografía por contraste de interferencia de Nomarski de células del alga verde *Botryococcus braunii*. Nótense las gotas de petróleo, producidas y secretadas por este alga, en el margen de las células.

✓ 19.17 Revisión de conceptos

Generalmente, los hidrocarburos son estables en los ambientes anóxicos, pero en los óxicos se encuentran expuestos al ataque microbiano. Los microorganismos oxidadores de hidrocarburos se utilizan para el Biorremedio de suelos contaminados por petróleo, añadiendo nutrientes inorgánicos para estimular esa actividad. Algunas algas producen hidrocarburos.

- ✓ ¿Qué es el *biorremedio*?
- ✓ ¿Por qué la adición de los nutrientes inorgánicos estimula la degradación del petróleo y la adición de glucosa puede que no?

19.18 Biodegradación de compuestos xenobióticos

Los **xenobióticos** son compuestos químicos sintéticos que no existen de manera natural. En esa categoría se incluye una larga lista de compuestos, como plaguicidas, bifeniles policlorados (PCB, usados por las industrias eléctricas y relacionadas), municiones, tintes y disolventes clorados. Muchos xenobióticos están relacionados estructuralmente, algunos en gran medida, con compuestos naturales, por lo que pueden ser degradados lentamente por enzimas que ya existen para realizar esa tarea. En otros casos, los compuestos son de estructura tan diferente a cualquier compuesto «natural» que un organismo no se lo ha podido encontrar anteriormente, por lo que la velocidad de degradación en la naturaleza es extremadamente baja, si es que ocurre. Sin embargo, en muchos xenobióticos se han encontrado microorganismos que pueden degradarlos. Vamos a centrarnos aquí en los plaguicidas, como un ejemplo de potencial degradación microbiana.

Un importante aspecto de los xenobióticos, que va más allá de la propia descontaminación ambiental, es que permiten comprender la *genética* de los microorganismos degradadores. Además de centrarse en cuestiones aplicadas, por ejemplo, cómo podemos los humanos acelerar la degradación de los xenobióticos en la naturaleza, los microbiólogos también están interesados en problemas más básicos, entre ellos, la naturaleza y regulación de los genes que codifican las proteínas que degradan estos compuestos. Los organismos capaces de llevar a cabo las actividades de Biorremedio (*véase*, por ejemplo, Figura 19.50) tienen evidentemente genes clave para la degradación, y los biotecnólogos saben que estos genes podrían ser introducidos en otros organismos, especialmente en las plantas. Los *organismos modificados genéticamente* (*véase* Sección 31.7), con características nuevas o mejoradas para degradar diversos compuestos xenobióticos, es de suponer que tendrán una gran importancia en el futuro, por dos razones. En primer lugar, porque ayudarán a limpiar el ambiente. Y, en segundo, porque permitirán el *uso continuado* de xenobióticos, en especial de herbicidas (Tabla 19.7), en la agricultura. De hecho, muchos de estos productos ya han demostrado gran efectividad y han permitido una elevada productividad en los sistemas actuales de cultivo intensivo. Por esta razón, el uso continuado de plaguicidas xenobióticos es una realidad que va a continuar. Así pues, el conocimiento de la genética de la biodegradación es un aspecto importante en el campo del biorremedio y debería ayudar al desarrollo de nuevas tecnologías para la descontaminación del ambiente y la productividad agrícola.

TABLA 19.7 Persistencia de herbicidas e insecticidas en el suelo

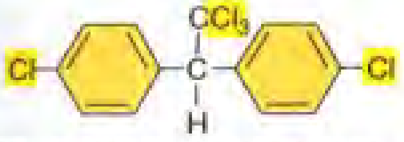
Sustancia	Tiempo requerido para la desaparición del 75-100%
Insecticidas clorados	
DDT [1,1,1- tricloro-2,2-bis-(*p*-clorofenil)etano][a]	4 años
Aldrina	3 años
Clordano	5 años
Heptacloro	2 años
Lindano (hexaclorociclohexano)	3 años
Insecticidas organofosforados	
Diazinón	12 semanas
Malatión[a]	1 semanas
Paratión	1 semanas
Herbicidas	
2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)	4 semanas
2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético)	20 semanas
Dalapina	8 semanas
Atrazina[a]	40 semanas
Simazina	48 semanas
Propazina	1,5 años

[a] En la Figura 19.49 se muestra la estructura química.

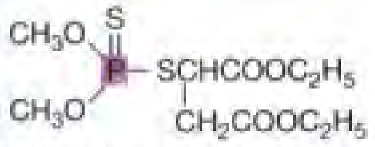
Plaguicidas

Algunos de los xenobióticos más ampliamente distribuidos son los **plaguicidas**, que son componentes frecuentes de los residuos tóxicos. Se han comercializado más de 1000 plaguicidas, con la finalidad de controlar químicamente diferentes plagas. Éstos incluyen principalmente *herbicidas*, *insecticidas* y *fungicidas*. La estructura de los plaguicidas es muy diversa, encontrando compuestos clorados, anillos aromáticos, moléculas con fósforo y nitrógeno, etc. (Figura 19.49). Algunas de estas sustancias sirven como fuentes de carbono y donadores de electrones para algunos microorganismos del suelo, mientras que otras no. Si una sustancia puede ser atacada por microorganismos tenderá a desaparecer del suelo. Esta degradación es deseable porque se evita la acumulación tóxica del compuesto. Sin embargo, incluso compuestos estrechamente relacionados pueden diferir mucho en su degradabilidad, como se ve por la diferente de persistencia de diversos herbicidas que se muestran en la Tabla 19.7.

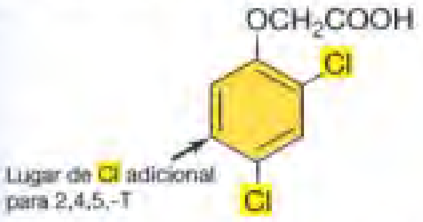
Los números de la Tabla 19.7 son sólo aproximaciones, ya que diversos factores ambientales, como temperatura, pH, aireación y contenido de materia orgánica del suelo influyen en la descomposición. Algunos insecticidas clorados son tan recalcitrantes que persisten por periodos de más de 10 años. La desaparición de un plaguicida de un ecosistema no significa necesariamente que haya sido degradado por microorganismos, ya que su pérdida puede deberse también a volatilización, lixiviado o rotura química espontánea. La *biodisponibilidad*



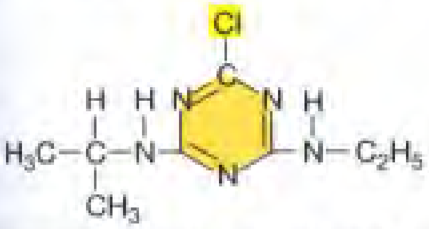
DDT; diclorodifeniltricloroetano
(compuesto organoclorado)



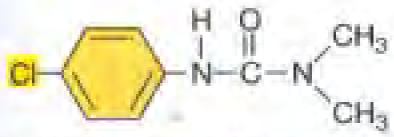
Malatión; éster dietilo del ácido mercaptosuccínico
(compuesto organofosforado)



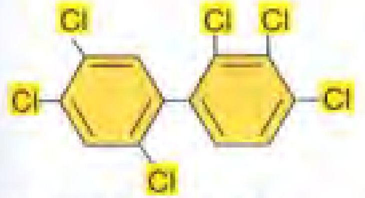
2,4-D; ácido 2,4-diclorofenoxiacético
(derivado del ácido diclorofenoxiacético)



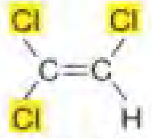
Atracina, 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilaminotracina
(derivado de triacina)



Monurón; 3-(4-clorofenil)-1,1-dimetilurea (urea sustituida)



Bifenil clorado (PCB);
se muestra 2, 3, 4, 2′, 4′, 5′-hexaclorobifenilo



Tricloroetileno

Figura 19.49 Algunos compuestos xenobióticos. Aunque ninguno de estos compuestos se da en la naturaleza, existen varios microorganismos (o se han desarrollado experimentalmente) que pueden degradarlos (los datos de persistencia se pueden consultar en la Tabla 19.7).

es también un factor que controla el ataque microbiano de los compuestos xenobióticos. Muchos de ellos son bastante hidrofóbicos y, por tanto, no muy solubles en agua. La adsorción de esos compuestos xenobióticos a la materia orgánica y a la arcilla de suelos y sedimentos impide que los microorganismos accedan a ellos. La adición de tensioactivos o emulsionantes suele aumentar la biodisponibilidad, y, por ende, la biodegradación, del compuesto xenobiótico.

Los microorganismos con capacidad para metabolizar plaguicidas y herbicidas son bastante diversos e incluyen géneros tanto de bacterias como de hongos. Algunos plaguicidas pueden ser a la vez fuente de carbono y energía, y son oxidados completamente a CO_2. Sin embargo, otros compuestos son mucho más recalcitrantes y sólo son atacados ligeramente, o no lo son en absoluto, aunque con frecuencia pueden ser degradados parcial o totalmente si en el ambiente hay algún otro tipo de materia orgánica que pueda servir de fuente de energía primaria; este fenómeno se conoce como **cometabolismo** o **cooxidación**. No obstante, cuando la degradación de la molécula es sólo parcial, el producto microbiano de un plaguicida puede ser, en algunas ocasiones, aún más tóxico que el compuesto original.

Decloración reductora

En el Capítulo 17 se ha tratado una forma de respiración anaeróbica llamada ***decloración reductora***, en la que compuestos orgánicos clorados se utilizan como aceptor terminal de electrones en condiciones anóxicas (*véase* Sección 17.18). La reducción de clorobenzoato a benzoato por la bacteria *Desulfomonile* es un modelo de laboratorio para el estudio de la decloración reductora:

$$C_7H_4O_2Cl^- + 2\,H \rightarrow C_7H_5O_2^- + HCl$$

Sin embargo, desde el punto de vista del biorremedio, otros compuestos clorados son mucho más importantes que el clorobenzoato. Por ejemplo, hay pruebas de decloración reductora de los compuestos dicloro-, tricloro- y tetracloro- (percloro-) etileno, cloroformo, diclorometano, algunos bifeniles policlorados (PCB; Figura 19.49), y varios compuestos con bromo y flúor. Estos compuestos tóxicos, de algunos de los cuales (especialmente del tricloroetileno, Figura 19.49) se sospecha que son carcinogénicos, se utilizan extensamente en la industria como disolventes, agentes desengrasantes y aislantes en los transformadores eléctricos. Suelen introducirse en ambientes anóxicos a través de vertidos accidentales, o por goteo, que se escapa lentamente de contenedores de almacenamiento o de transformadores eléctricos abandonados, desde donde llegan a las aguas subterráneas, lugar que en el caso de Estados Unidos es donde con más frecuencia se detectan esos contaminantes. Se conocen algunos géneros de microorganismos capaces de realizar una decloración reductora (*véase* Sección 17.18), que transforman diversos compuestos clorados en metabolitos inocuos. Existe un gran interés en el desarrollo de métodos que estimulen las actividades *in situ* de procariotas decloradores por reducción, como una estrategia de biorremedio de estos productos de tan elevada toxicidad en ambientes anóxicos.

Decloración aeróbica

También es posible la decloración aeróbica de compuestos clorados (Figura 19.50) pero aquí, por supuesto, participan reacciones bioquímicas en las que interviene *el* O_2. En esas condiciones, la degradación de compuestos aromáticos clorados tiene lugar mediante oxigenasas (*véase* Sección 17.22). Por ejemplo, en la degradación aeróbica del plaguicida 2,4,5-T por pseudomonas, después de la decloración una enzima dioxigenasa rompe el anillo aromático generando compuestos que son metabolizados por las vías metabólicas centrales (Figura 19.50*b*). Aunque la degradación aeróbica de xenobióticos orgánicos clorados tiene una importancia ecológica indudable, la decloración reductora presenta un interés ambiental especial a causa de la rapidez con que en la naturaleza los hábitat microbianos contaminados se hacen anóxicos y de las dificultades bioquímicas (Figura 19.50*b*) que esto conlleva para los organismos aeróbicos que, de otra manera, degradarían el compuesto.

Biodegradación de polímeros sintéticos y de plásticos biodegradables

Otro tema de especial importancia desde el punto de vista ambiental, además de la biodegradación de residuos tóxicos, como los plaguicidas y otros hidrocarburos clorados, lo constituye la eliminación de *residuos sólidos*, principalmente plásticos. Por lo general, los vertederos contienen grandes cantidades de papel, alimento, escombros y plásticos. La velocidad de degradación de estos materiales suele ser muy baja debido a que las condiciones, especialmente la falta de humedad y probablemente de oxígeno, no favorecen la actividad microbiana. Y, además, algunos de los productos añadidos a los vertederos son recalcitrantes por sí mismos. El plástico es el ejemplo típico.

La industria del plástico produce actualmente cerca de 40.000 *millones* de kilogramos de plástico al año, de los cuales aproximadamente el 40% va a parar a vertederos. Los plásticos son polímeros xenobióticos de varios tipos, por ejemplo, polietileno, polipropileno y poliestireno (Figura 19.51). Muchos polímeros sintéticos son muy recalcitrantes, y permanecen sin alterarse durante décadas en los vertederos y en otros lugares de acumulación de residuos. El problema ha sido un incentivo para la búsqueda de alternativas *biodegradables* a los polímeros sintéticos. Se ha conseguido alguna mejora en este tema, incluyendo plásticos fotodegradables, plásticos que llevan incorporado almidón y plásticos de origen microbiano.

El plástico fotobiodegradable consiste en polímeros cuya estructura se altera mediante exposición a los rayos ultravioleta (procedentes del sol), y produce polímeros modificados susceptibles al ataque microbiano. En los plásticos que incorporan almidón (*véase* Figura 3.6*a*), éste une fragmentos cortos de un segundo polímero biodegradable. Esta estructura acelera la biodegradación porque las bacterias del suelo que digieren el almidón atacan este compuesto, liberando fragmentos del polímero que después degradan otros microorganismos.

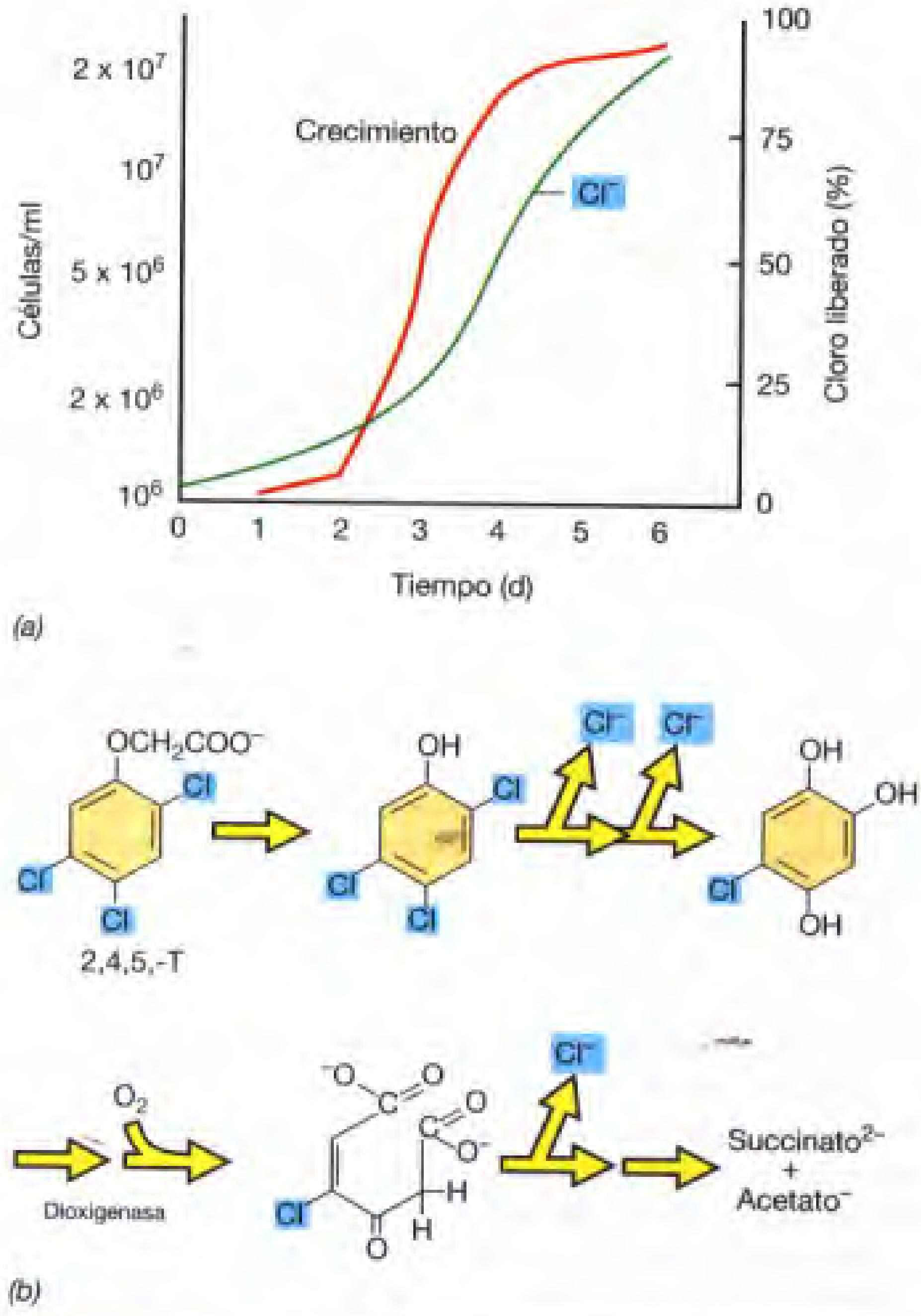


Figura 19.50 Biodegradación del herbicida 2,4,5-T. (a) Crecimiento de *Burkholderia* (antes *Pseudomonas*) *cepacia* sobre 2,4,5-T como única fuente de carbono y energía. La cepa se enriqueció usando un quimiostato para mantener baja la concentración de herbicida. El crecimiento aquí es aeróbico sobre 1,5 g/l de 2,4,5-T. La liberación de cloro de la molécula indica biodegradación. (b) Vía de la degradación aeróbica de 2,4,5-T. Nótense los pasos en la liberación de Cl^-. Los productos finales, succinato y acetato, son catabolizados en el ciclo del ácido cítrico (*véase* Figura 5.22). El mecanismo de acción de una dioxigenasa se trata en el Capítulo 17 (*véase* Figura 17.56c)

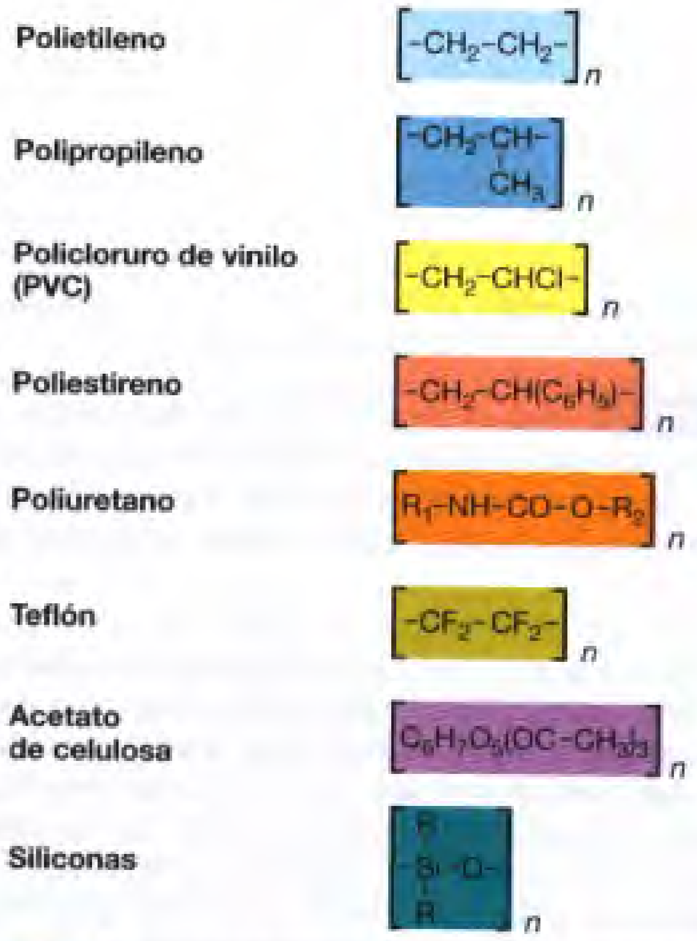
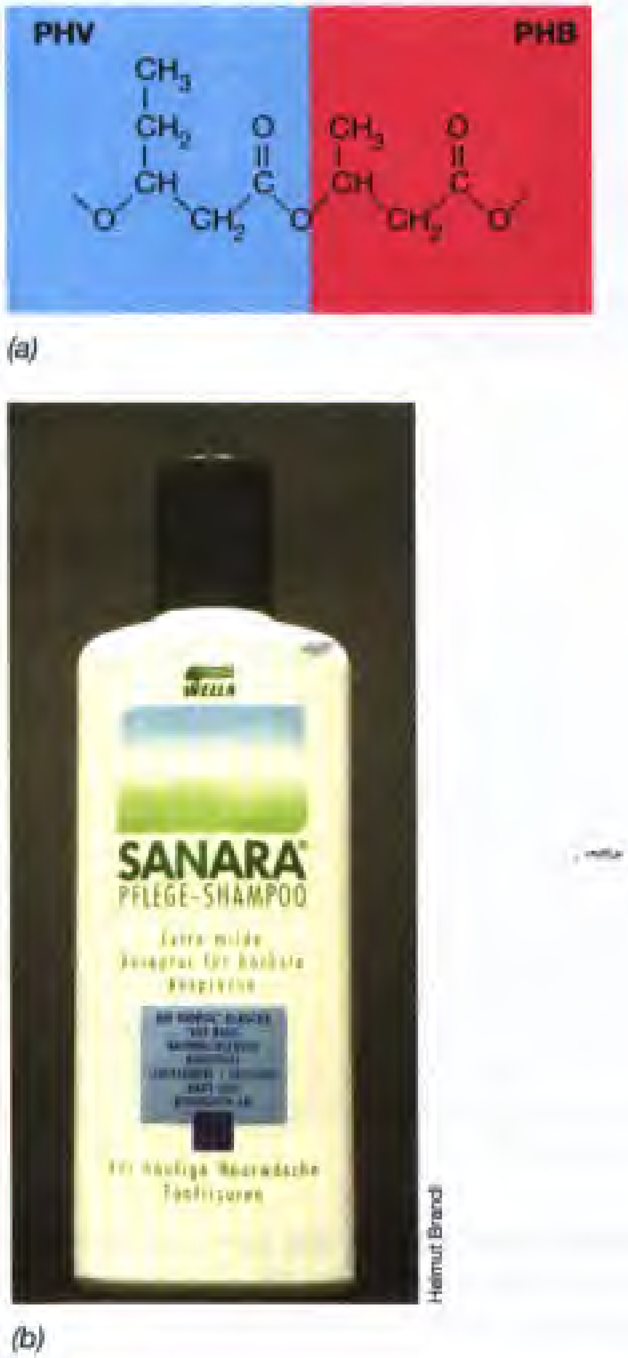


Figura 19.51 Química de polímeros sintéticos. Estructura del monómero de algunos polímeros sintéticos comunes.

Entre los plásticos sintetizados por actividad microbiana se encuentran un polímero de reserva de carbono, el *poli-β-hidroxicalcanoato*, PHA (*véanse* Sección 4.13 y Figura 19.52), que se considera un biopolímero sustituto de los plásticos sintéticos. Los PHA poseen muchas de las propiedades generales de los plásticos sintéticos y pueden ser sintetizados por las células de diferentes maneras. Sobre la base de la longitud de la cadena lateral de los monómeros del polímero (una propiedad que se puede variar modificando el medio de crecimiento o por manipulación genética de la bacteria productora), se obtienen PHA que difieren punto de fusión, cristalinidad, flexibilidad y fuerza de torsión, y que son adecuados para diferentes aplicaciones. Un *copolímero* que contiene aproximadamente cantidades equivalentes de PHB (poli-b-hidroxibutirato) y PHV (poli-b-hidroxivalerato) (Figura 19.52*a*) ha conseguido el mayor éxito comercial conocido hasta ahora.



Helmut Brandl

Figura 19.52 (a) Copolímero PVH/PHB. (b) Una marca de champú comercializado en Europa y envasado en una botella de «plástico bacteriano». La botella se compone de un copolímero de poli-β-hidroxibutirato (PHB) y poli-β-hidroxivalerato (PHV). Al tratarse de un producto natural, la botella se degrada tanto aeróbica como anaeróbicamente.

✓ 19.18 Revisión de conceptos

Muchos compuestos de síntesis química como insecticidas, herbicidas y plásticos (todos ellos conocidos como xenobióticos) son completamente extraños en el ambiente, pero a menudo pueden ser degradados por uno u otro organismo procariota. Se conocen mecanismos tanto aeróbicos como anaeróbicos.

- ✓ ¿Qué características químicas comparten los compuestos que aparecen en la Figura 19.49?
- ✓ ¿Qué es una *decloración reductora* y en qué se diferencia de las reacciones de la Figura 19.50?
- ✓ ¿Cuáles son las ventajas de los *biopolímeros* sobre los polímeros sintéticos?

VII INTERACCIONES MICROBIANAS CON PLANTAS

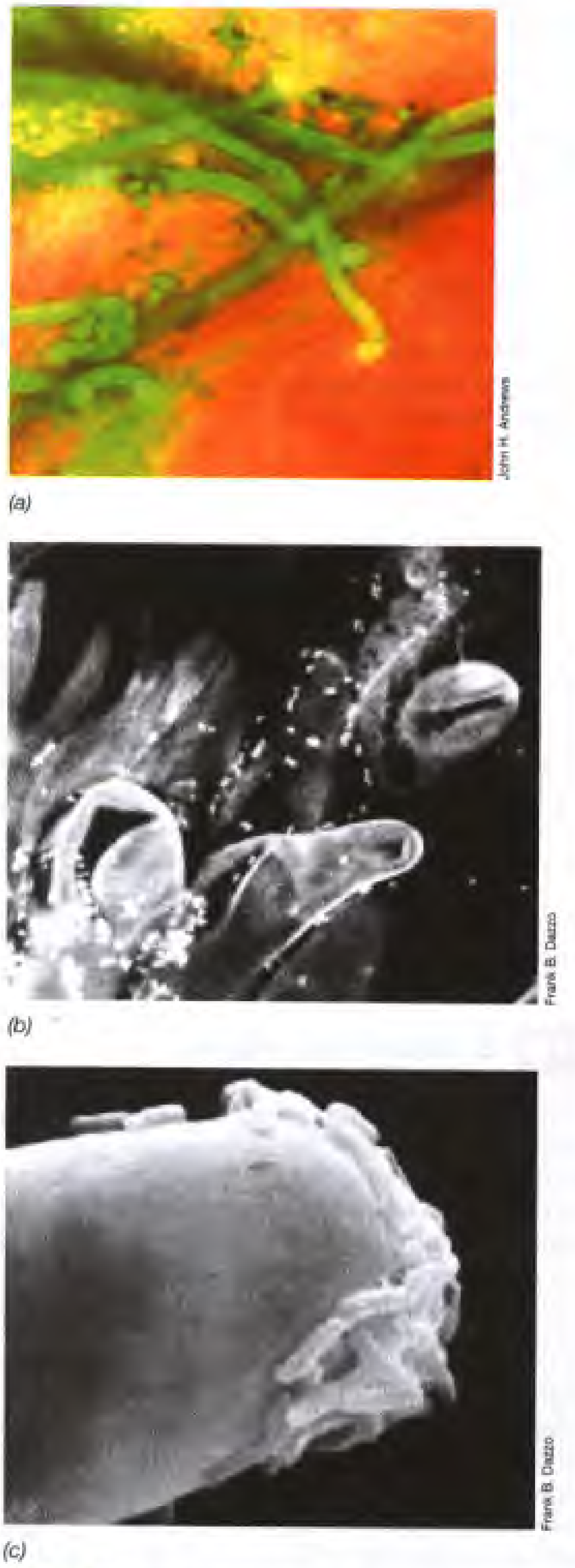
Acabaremos este capítulo con tres ejemplos de interacciones microbianas con plantas. Existen numerosas asociaciones simbióticas beneficiosas, como los líquenes, micorrizas y los nódulos radicales en plantas leguminosas. También existen microorganismos destructores que producen enfermedades en plantas, como las agallas del tallo. Aunque muchas de estas enfermedades son conocidas y estudiadas por los patólogos de plantas, aquí consideraremos sólo ese tipo de agallas debido a las especiales características de la enfermedad y de su transmisión por microbios.

19.19 El ambiente vegetal

Las plantas, consideradas como hábitat microbianos, son claramente muy diferentes a los animales. La temperatura de las plantas varía mucho más que la de los animales homeotermos, tanto a lo largo del día como del año. Además, el sistema de comunicación interna del vegetal, comparado con los complejos sistemas circulatorios de los animales, está muy poco desarrollado. Por tanto, la transferencia de microorganismos dentro de la planta es relativamente ineficiente. Las partes de las plantas que emergen del suelo, especialmente las hojas y los tallos, están sujetas a frecuentes desecaciones, y, por esta razón, muchas plantas han desarrollado cubiertas céreas que retienen la humedad e impiden la entrada de microorganismos. Por otra parte, las raíces se encuentran en un ambiente donde la humedad varía menos y la concentración de nutrientes es mayor. Por esta razón, las raíces de las plantas son la principal zona de actividad microbiana en los vegetales.

Rizosfera y filosfera

La **rizosfera** es la región del suelo inmediata a la raíz; es una zona donde la actividad microbiana suele ser intensa. El **rizoplano** está constituido por la superficie de la raíz. El recuento de bacterias casi siempre es superior en la rizosfera/rizoplano que en las regiones del suelo donde no hay raíces; a veces, puede ser muchas veces superior (Fi-



John H. Andrews
Frank B. Dazzo
Frank B. Dazzo

Figura 19.53 Vida microbiana en la filosfera y la rizosfera. (a) Micrografía de fluorescencia del hongo *Aureobasidium pullulans* sobre el filoplano (superficie de la hoja) de un manzano. Las células están teñidas con FISH (*véase* Sección 18.4) y tanto los filamentos fúngicos como la esporas muestran la tinción verdosa. Un filamento fúngico mide unos 7 µm de diámetro. (b) Micrografía confocal láser de barrido (*véase* Sección 4.2) de células bacterianas en la rizosfera/rizoplano de un trébol. (c) Micrografía electrónica de barrido de células de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* adheridas a un pelo radical del trébol. Las células bacterianas en (b) y en (c) miden alrededor de 1 µm de diámetro.

gura 19.53). Esto se debe al hecho de que las raíces excretan cantidades considerables de azúcares, aminoácidos, hormonas y vitaminas, estimulando un crecimiento tan intenso de bacterias y hongos que estos organismos a menudo forman microcolonias en la superficie de las raíces. La **filosfera** es la superficie de la hoja de la planta y cuando la humedad es elevada, como ocurre en los bosques húmedos de las zonas templadas y tropicales, la microbiota de las hojas puede ser muy abundante, comprendiendo tanto hongos como bacterias (*véase* Figura 19.53*a*). Muchas de las bacterias que viven sobre las hojas fijan nitrógeno (*véanse* Secciones 17.28 y 19.22), y es probable que este mecanismo ayude a estos organismos a desarrollarse con los nutrientes que les proporcionan las hojas, que son predominantemente carbohidratos.

✓ 19.19 Revisión de conceptos

En las plantas, los hábitat microbianos clave son el rizoplano, la rizosfera y la filosfera.

✓ ¿Por qué las raíces de las plantas son un ambiente más atractivo para las bacterias que el suelo desprovisto de vegetación?

19.20 Líquenes y micorrizas

Los **líquenes** son formaciones foliáceas o incrustantes muy frecuentes en la naturaleza, que suelen encontrarse sobre rocas, troncos de árboles, tejados de casas y en suelos desnudos (Figura 19.54). Los líquenes son una simbiosis de dos organismos, un hongo y una alga o una cianobacteria (anteriormente llamadas «algas azules»). Sin embargo, la relación entre estos organismos es muy poco específica, ya que un hongo determinado puede formar un liquen en simbiosis con varias especies distintas de algas; y lo mismo ocurre en el caso contrario. El alga es un organismo fototrófico, con capacidad de producción de materia orgánica, que sirve para alimentar al hongo. El hongo, incapaz de llevar a cabo la fotosíntesis, proporciona al alga un anclaje firme en el que pueda desarrollarse protegida de la erosión, el viento o la lluvia. Además, el hongo facilita la incorporación de agua y absorbe de la roca o de los otros sustratos donde se encuentra los nutrientes inorgánicos esenciales para el crecimiento del alga. Los líquenes suelen localizarse en superficies donde no crecen otros organismos, y su éxito en la colonización de dichos ambientes se debe a las interrelaciones que se establecen entre el alga y el hongo que los integran.

Estructura y ecología de los líquenes

Los líquenes están formados por una asociación densa de muchas células fúngicas, en las cuales se incrustan las células del alga (Figura 19.55). La forma del liquen está determinada principalmente por el hongo, una gran variedad de éstos pueden formar líquenes. La diversidad de los tipos de alga es mucho menor, y muchos tipos de liquen pueden tener la misma alga. En algunos líquenes, el componente fototrófico puede ser una cianobacteria, frecuentemente es-

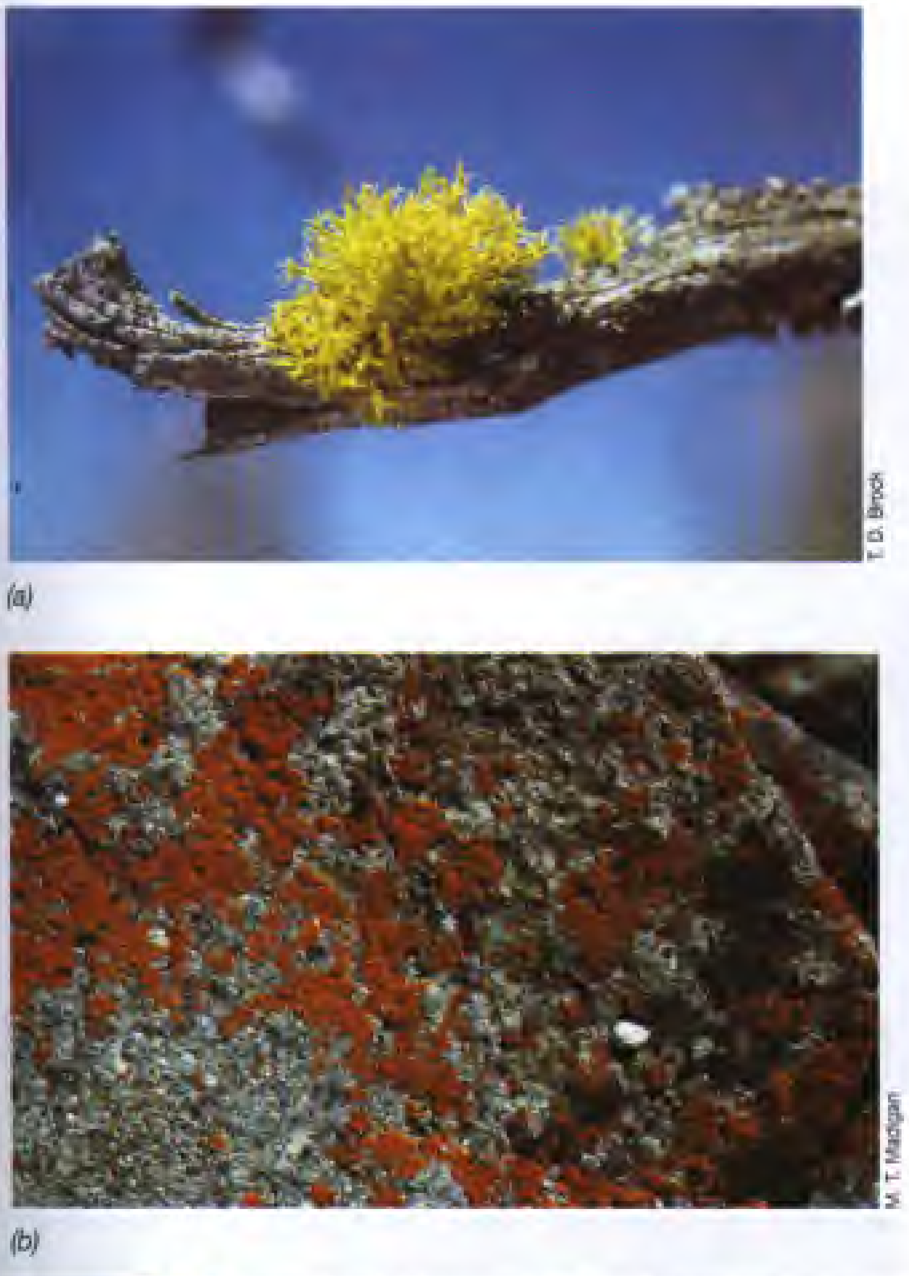


Figura 19.54 Líquenes. (a) Crecimiento de un liquen sobre la rama de un árbol muerto. (b) Líquenes cubriendo la superficie de una gran roca.

pecies fijadoras de N_2, en vez de un alga. Las algas o cianobacterias suelen encontrarse en capas definidas o en agrupaciones en el interior de la estructura del liquen.

El hongo se beneficia claramente de su asociación con el alga, pero cabe preguntarse qué beneficio obtiene el alga. Los *ácidos liquénicos* son compuestos orgánicos complejos excretados por el hongo que estimulan la disolución y la quelación de nutrientes. Otra función del hongo es proteger el alga de la desecación; la mayoría de los hábitat en que viven los líquenes son secos (roca, suelo desnudo, tejados) (*véase* Figura 19.54) y, en general, los hongos toleran mucho mejor que las algas las condiciones secas.

La mayoría de los líquenes son de crecimiento muy lento; un ejemplar de dos centímetros sobre la superficie de una roca puede tener varios años. Su crecimiento varía desde un centímetro, o menos, por año, hasta más de 3 cm/año, según los organismos que integren la simbiosis, la cantidad de lluvia y de sol, recibidos y las condiciones meteorológicas generales.

Micorrizas

Micorriza significa literalmente «hongo de la raíz» y se refiere a la asociación simbiótica entre las raíces de las plantas y los hongos. Es muy probable que la mayoría de las plantas terrestres posean micorrizas. Hay dos clases generales de micorrizas: **ectomicorrizas**, en las cuales las células fúngicas forman una vaina alrededor del exterior de la raíz, con sólo una pequeña penetración de las hifas hacia el propio tejido radicular; y las **endomicorrizas**, en las cuales el micelio del hongo se encuentra incrustado en el tejido de la raíz.

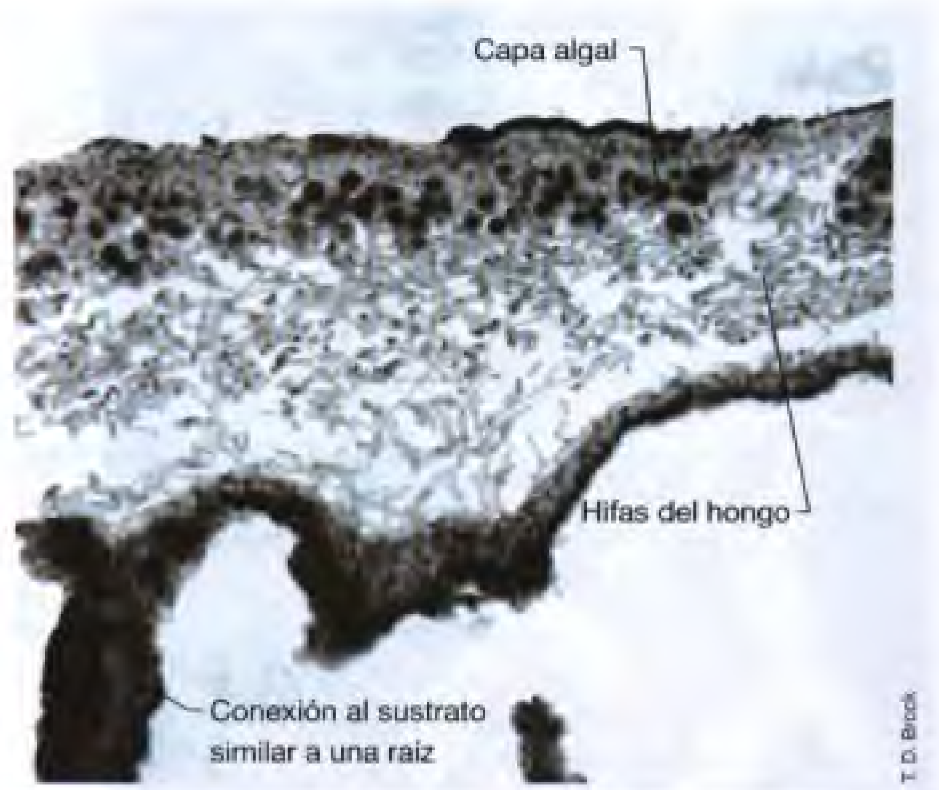


Figura 19.55 Micrografía de una sección transversal de un liquen.

Las ectomicorrizas se encuentran principalmente en los árboles que forman bosques, especialmente en las coníferas, hayas y robles, y están más desarrolladas en los bosques boreales y de zonas templadas. En esos bosques, casi todas las raíces de los árboles contienen micorrizas. El sistema radicular de un árbol con micorrizas está formado por raíces largas y cortas. Las cortas, que presentan una ramificación dicotómica característica, como en el género *Pinus* (Figura 19.56*a*), muestran la colonización fúngica típica, pero las raíces largas también están frecuentemente colonizadas. Las endomicorrizas son todavía más comunes que las ectomicorrizas. Las *micorrizas arbustivas*, un tipo de endomicorriza, se encuentran en las raíces de aproximadamente el 80% de todas las especies vegetales terrestres que se han examinado, por lo que se considera una simbiosis de vegetal casi universal.

La mayoría de los hongos de las micorrizas no atacan la celulosa ni las hojas degradadas, sino que usan carbohidratos simples para su crecimiento. Por lo general, presentan uno o más requerimientos vitamínicos; obtienen carbono de las secreciones de la planta, pero los minerales inorgánicos provienen del suelo. Estos hongos raramente se encuentran solos en la naturaleza; se conocen únicamente asociados a las raíces, por lo que pueden ser considerados simbiontes estrictos. Producen sustancias para el crecimiento de las plantas que inducen alteraciones morfológicas en las raíces y estimulan la formación de micorrizas. A pesar de la íntima relación que existe entre el hongo y la raíz, se encuentra poca especificidad; una misma especie de pino puede establecer micorrizas con más de 40 especies de hongo.

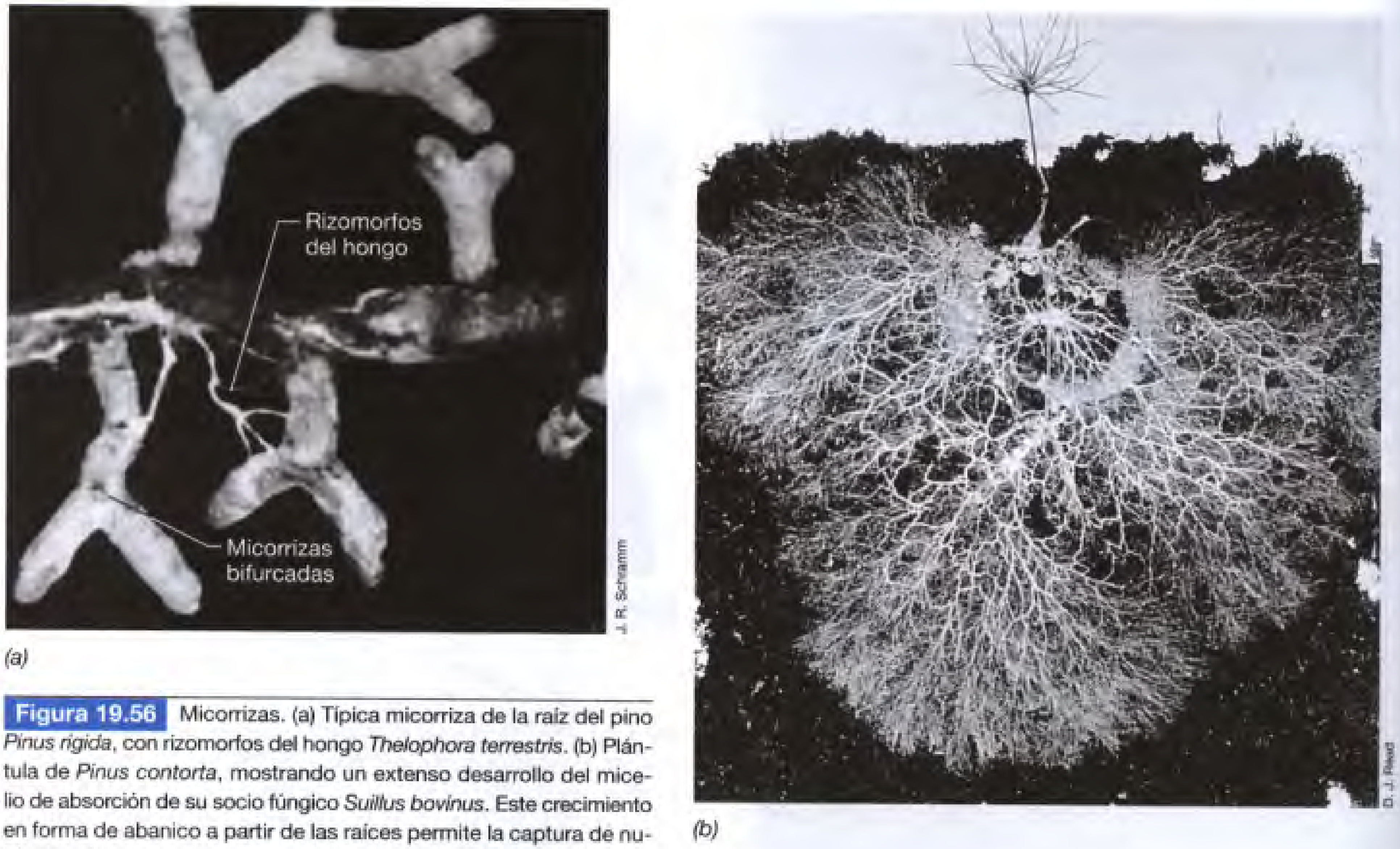


Figura 19.56 Micorrizas. (a) Típica micorriza de la raíz del pino *Pinus rigida*, con rizomorfos del hongo *Thelophora terrestris*. (b) Plántula de *Pinus contorta*, mostrando un extenso desarrollo del micelio de absorción de su socio fúngico *Suillus bovinus*. Este crecimiento en forma de abanico a partir de las raíces permite la captura de nutrientes del suelo.

El efecto beneficioso que la planta obtiene del hongo de la micorriza se observa mejor en suelos pobres, en los cuales los árboles con micorrizas crecen bien, a diferencia de los que no las poseen. Cuando se plantan árboles en praderas, que normalmente carecen del inóculo fúngico adecuado, los árboles inoculados artificialmente crecen mucho más deprisa que los árboles sin inocular (Figura 19.57). Es bien conocido que las plantas que poseen micorrizas pueden absorber nutrientes de su ambiente con más eficiencia que las que no las poseen. Es probable que esta mejora en la absorción se deba a la mayor superficie que proporciona el micelio del hongo; por ejemplo, en las semillas de pino de la Figura 19.56*b*, el micelio fúngico de ectomicorriza constituye la parte dominante del área de absorción de la planta.

Pero además de ayudar a la planta a absorber nutrientes, las micorrizas también parecen desempeñar una función importante en el control de la diversidad vegetal. De hecho, los experimentos de campo han mostrado una correlación positiva entre la abundancia y la diversidad de las micorrizas en el suelo y la extensión de la diversidad vegetal que se desarrolla en él. De esta forma, las micorrizas son un buen ejemplo de la simbiosis planta-microorganismo que benefician a ambos componentes. La planta con micorriza mejora su función fisiológica y compite con éxito en una comunidad de plantas rica en especies, mientras que el hongo se beneficia de un aporte constante de nutrientes orgánicos.

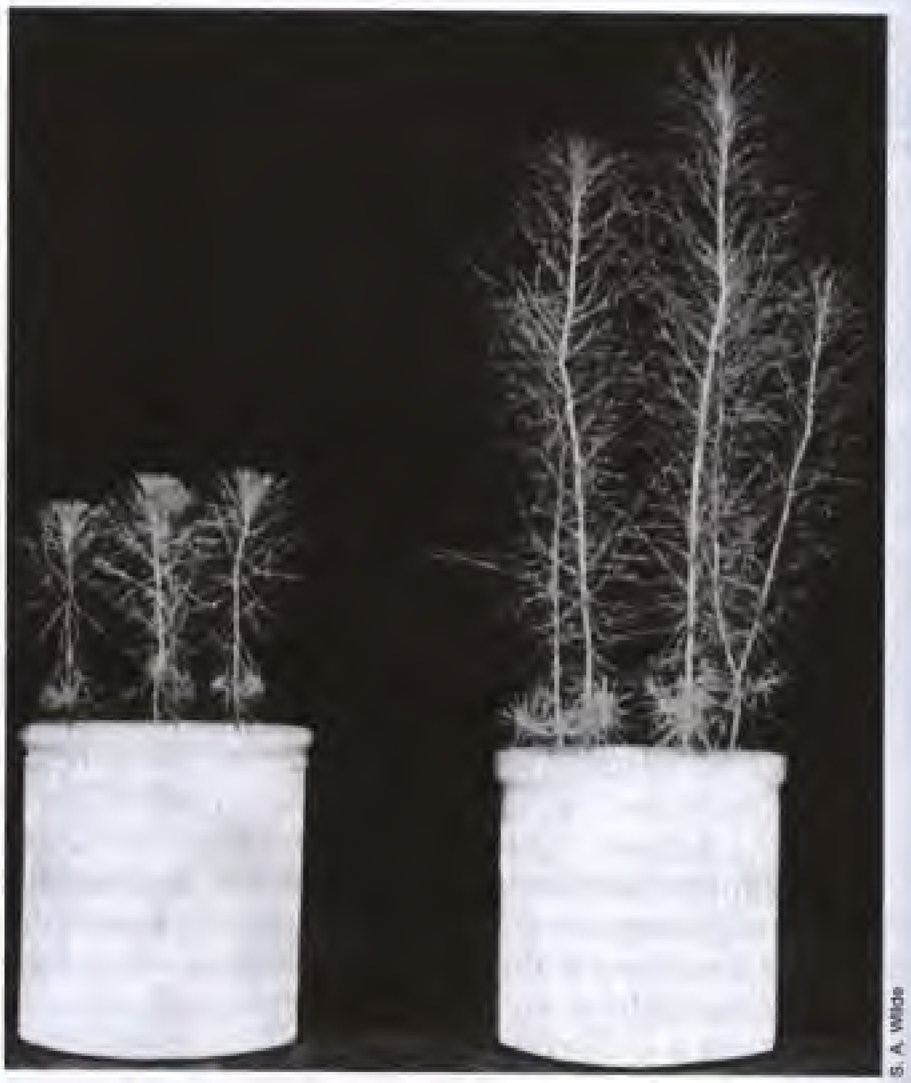


Figura 19.57 Plantas de seis meses de un pino de Monterrey (*Pinus radiata*) crecido en un suelo de pradera: izquierda, sin micorrizas; derecha, con micorrizas.

✓ *19.20 Revisión de conceptos*

Los líquenes son asociaciones simbióticas entre un hongo y un alga o cianobacteria. Las micorrizas son hongos que se asocian con las raíces de las plantas y mejoran su capacidad de absorber nutrientes. Las micorrizas tienen un efecto altamente beneficioso en la salud de la planta y en su competitividad.

- ✓ ¿En qué se diferencian las *endomicorrizas* de las *ectomicorrizas*?
- ✓ ¿Por qué la asociación de micorrizas con plantas se considera un tipo de simbiosis?

19.21 Tumoración por *Agrobacterium*

Algunos microorganismos son patógenos de plantas y les provocan enfermedades. El género *Agrobacterium* comprende organismos que causan la formación de crecimientos tumorales en una gran variedad de plantas. Las dos especies mejor estudiadas son *A. tumefaciens*, que causa las *agallas* del tallo y *A. rhizogenes*, que da lugar a *raíces pilosas*.

Cuando se produce una herida en su superficie, las plantas suelen formar acumulaciones benignas de tejido, llamadas **callosidades**, allí donde se ha producido la herida. Sin embargo, el crecimiento inducido por *A. tumefaciens* (Figura 19.58) es distinto, ya que el callo crece de manera incontrolada. Es más parecido al crecimiento de un tumor en los animales y ha sido objeto de muchas investigaciones pensando que puede proporcionar un modelo para conocer los mecanismos del crecimiento maligno de un tejido en los humanos. Es interesante saber que, una vez inducidos, estos tumores continúan su crecimiento en ausencia de *Agrobacterium*. De esta forma, una vez que *Agrobacterium* ha inducido la formación de un tumor, su presencia ya no es necesaria.

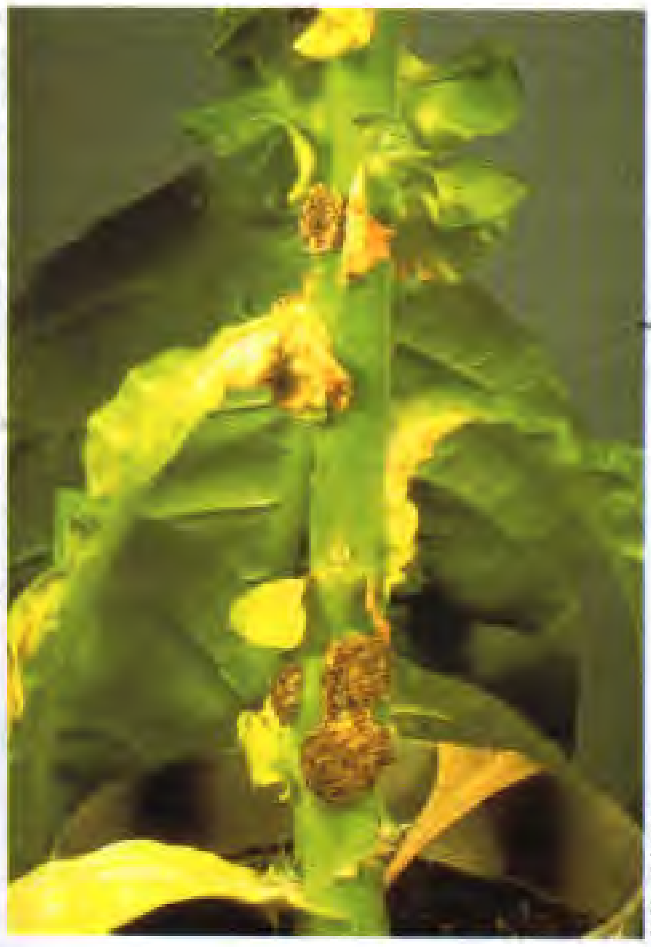

Jo Handelsman

Figura 19.58 Fotografía de las tumoraciones de una planta de tabaco causado por bacterias del género *Agrobacterium*.

La Figura 19.59 muestra una visión general de los acontecimientos que se suceden en la formación de las tumoraciones. Se sabe que un plásmido de gran tamaño llamado **plásmido Ti** (de «*t*umor *i*nduction») (Figura 19.60) debe estar presente en las células de *Agrobacterium* para que éstas induzcan la formación del tumor. En *Agrobacterium rhizogenes*, un plásmido similar llamado *plásmido Ri* es necesario para la inducción de la enfermedad de las raíces

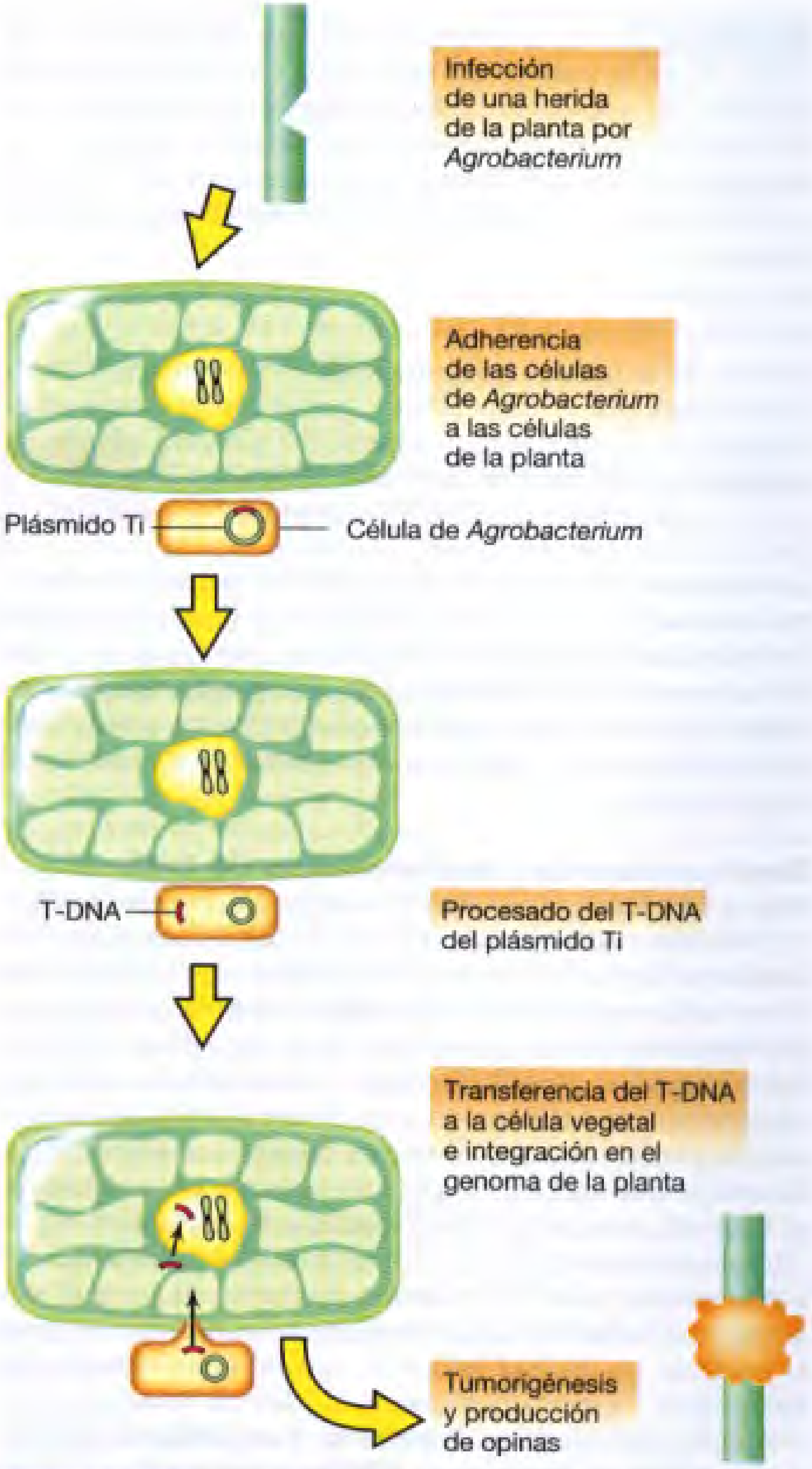

Infección de una herida de la planta por *Agrobacterium*
Adherencia de las células de *Agrobacterium* a las células de la planta
Plásmido Ti
Célula de *Agrobacterium*
T-DNA
Procesado del T-DNA del plásmido Ti
Transferencia del T-DNA a la célula vegetal e integración en el genoma de la planta
Tumorigénesis y producción de opinas

Figura 19.59 Sucesión de etapas que tienen lugar tras la infección de una planta susceptible por *Agrobacterium tumefaciens*. Sólo la porción T-DNA del plásmido Ti se transfiere a la planta.

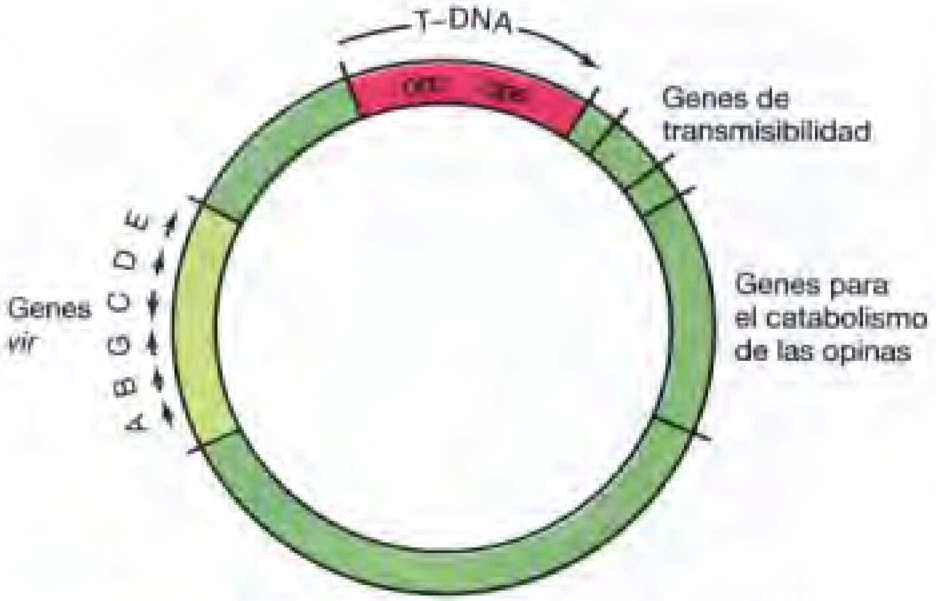

T-DNA
onc
ops
Genes de transmisibilidad
Genes para el catabolismo de las opinas
Genes *vir*
A
B
G
C
D
E

Figura 19.60 Estructura del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. T-DNA es la región que se transfiere a la planta; *vir*, genes de virulencia; *onc*, oncogenes (genes tumorígenos); *ops*, genes de síntesis de opina. Las flechas indican la dirección de la transcripción de cada gen. El plásmido Ti completo tiene alrededor de 200 kb de DNA y el T-DNA unas 20 kb (*véase* Sección 31.7 para más detalles del plásmido Ti).

pilosas. El sistema mejor estudiado es la formación de tumoraciones por *A. tumefaciens*, y nos centraremos en él. Después de la infección, una parte del plásmido Ti, que se denomina *DNA de transferencia* (T-DNA), se integra en el genoma de la planta. El T-DNA es portador de los genes para la formación del tumor, y también para la producción de diferentes aminoácidos modificados llamados **opinas**. La *octopina* [N^2-(1,3-dicarboxietil)-L-arginina] y la *nopalina* [N^2-(1,3-dicarboxipropil)-L-arginina] son las dos opinas más comunes. Estos aminoácidos son producidos por células vegetales transformadas por el T-DNA, y son la fuente de carbono y nitrógeno para las células de *Agrobacterium* (Figura 19.59).

Reconocimiento y transferencia de DNA

Para que se inicie el estado tumoral, las células de *Agrobacterium* deben adherirse primero al lugar donde exista una herida en la planta. En el reconocimiento de *Agrobacterium* por el tejido vegetal intervienen moléculas receptoras complementarias que se encuentran en la superficie de las células vegetales y de la bacteria. Se cree que la molécula receptora en la planta es un tipo de *pectina* (un polisacárido complejo) y que el receptor bacteriano es un tipo de polisacárido que contiene b-glucanos, que está incrustado en el lipopolisacárido de la pared celular bacteriana.

Estudios realizados con mutantes de *Agrobacterium tumefaciens* que no forman tumores muestran claramente que la mayoría de las funciones necesarias para la adherencia de la bacteria a la planta tienen su origen en el cromosoma bacteriano. Después del ataque la bacteria sintetiza rápidamente microfibrillas de celulosa que actúan de anclaje de las células al lugar de la herida; las bacterias quedan atrapadas y dan lugar a un voluminoso agregado bacteriano sobre la superficie de la célula vegetal. Esto permite la transferencia del plásmido de la bacteria a la planta.

La Figura 19.60 muestra la estructura del plásmido Ti. Obsérvese que, aunque se necesitan bastantes genes para que haya infectividad, sólo una pequeña porción de plásmido Ti, una región llamada T-DNA (Figuras 19.59 y 19.60), es transmitida a la planta. El T-DNA contiene genes que inducen la tumorigénesis. Los genes *vir* que se encuentran en el plásmido Ti codifican proteínas que son esenciales para la transferencia del T-DNA (Figura 19.60). La expresión del gen *vir* es inducida por moléculas señal de la planta sintetizadas por los tejidos vegetales heridos. Se han identificado algunos inductores, incluidos los compuestos fenólicos acetosiringona, ácido *p*-hidroxibenzoico y vanilina.

Los genes *vir* son la clave para la transferencia del T-DNA. El gen *virA* codifica una proteína quinasa que interacciona con moléculas señal y luego fosforila el producto del gen *virG* (Figura19.61). Éste último se activa por la fosforilación y activa a su vez otros genes *vir*. El producto del gen *virD* tiene actividad endonucleasa y corta el DNA del plásmido Ti en una región adyacente al T-DNA (Figuras 19.60 y 19.61). El producto del gen *virE* es una proteína de unión del DNA *monocatenario*, que une la cadena simple de DNA generada por la actividad de una endonucleasa y transporta ese pequeño fragmento de DNA a la célula vegetal. El producto del gen *virB* se localiza en la membrana de la bacteria, y determina la transferencia de la cadena simple de DNA de la bacteria a la planta.

La transferencia de T-DNA se produce mediante un proceso que se parece a la conjugación bacteriana (Figura 19.59 y 19.61). El T-DNA queda incorporado al genoma nuclear de la planta (no se infectan los genomas de los orgánulos de la célula vegetal), donde puede producirse la integración en cualquier sitio donde haya repeticiones en tándem específicas, inversas o directas. Los genes tumorigénicos (genes *onc*) del plásmido Ti (Figura 19.60) codifican enzimas que intervienen en la producción de hormonas vegetales, y como mínimo una enzima clave para la biosíntesis de la opina. La expresión de estos genes es lo que origina la formación del tumor. El plásmido Ri, que interviene en la enfermedad de las raíces pilosas, también contiene genes *onc*. En ese caso, sin embargo, los genes confieren a la planta una respuesta aumentada a la auxina, que lleva a la sobreproducción de tejido radicular, lo que causa los síntomas de la enfermedad. El plásmido Ri también codifica varias enzimas de la síntesis de la opina.

Ingeniería genética con el plásmido Ti

Desde el punto de vista de la microbiología y de la patología vegetal, tanto en las tumoraciones como en la enfermedad de las raíces pilosas interviene un tipo especial de interacción bacteria-planta, en la que el DNA bacteriano se transfiere físicamente al vegetal. Sin embargo, una vez comprendido el mecanismo de transferencia de DNA, quedó claro que el sistema Ti podría ser empleado por los científicos como un vector para la introducción en las plantas de DNA manipulado genéticamente; es decir, el Ti se convirtió en un sistema natural de transformación vegetal. De esta forma, con el paso de los años la atención al sistema Ti/tumoraciones ha pasado de considerarlo una enfermedad a ser la base de nuevas aplicaciones en la industria biotecnológica de plantas.

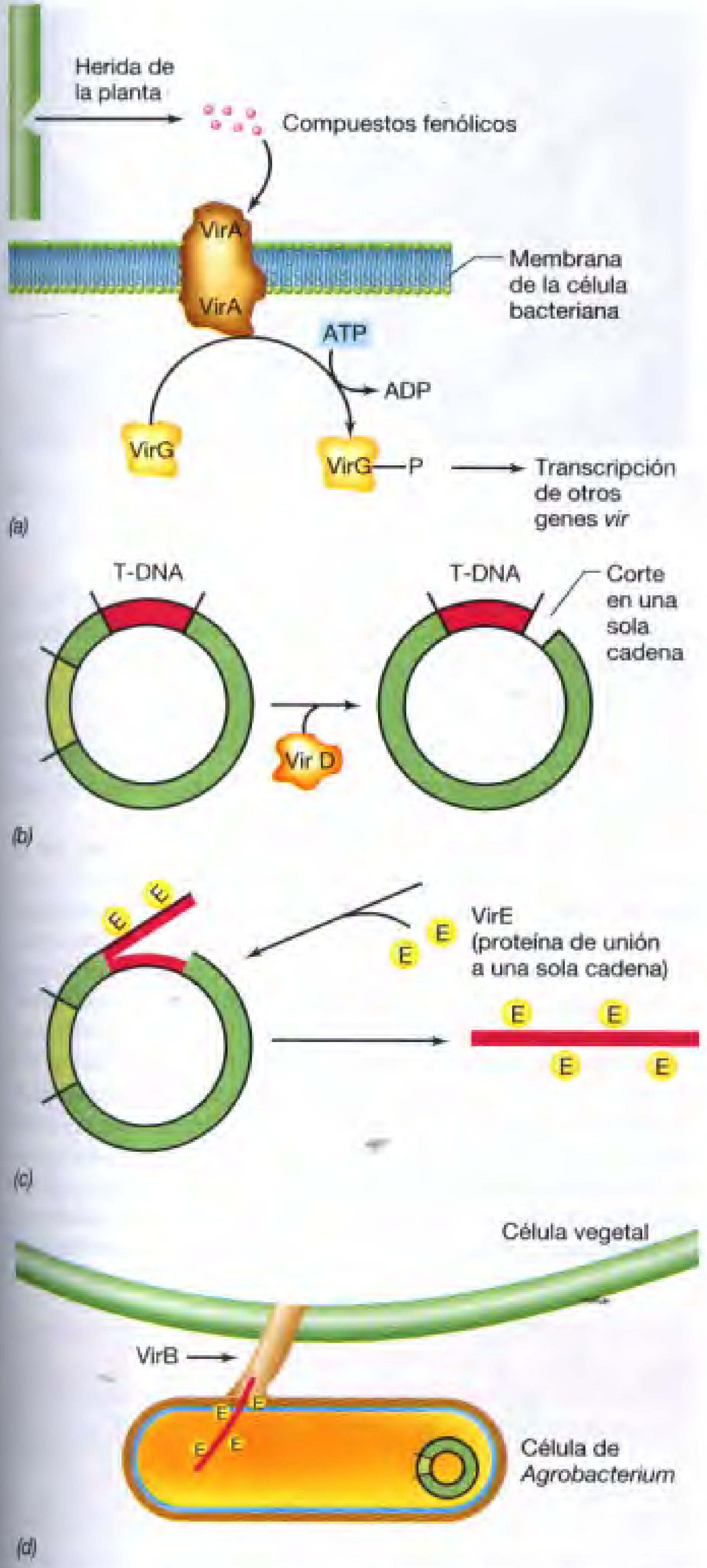


Figura 19.61 Mecanismo de transferencia de T-DNA a la célula de la planta por *Agrobacterium tumefaciens*. (a) Los niveles de proteína VirA aumentan enormemente con la estimulación por moléculas inductoras fenólicas de la planta. VirA activa VirG por fosforilación y VirG activa la transcripción de otros genes *vir*. (b) VirD es una endonucleasa. (c) VirE es una proteína de unión al DNA monocatenario, (d) VirB actúa como puente de conjugación entre *Agrobacterium* y la célula de la planta. La polimerasa del DNA de la planta produce la cadena complementaria al T-DNA transferido antes de que el DNA quede integrado en el genoma.

La experiencia demuestra que las plantas son difíciles de transformar. Pero hoy la ingeniería genética permite disponer de una panoplia de plásmidos Ti modificados («desarmados») para facilitar la producción de plantas transgénicas sin transferir genes de la enfermedad. Ya hay historias exitosas en áreas que se veían afectadas por resistencia a herbicidas e insectos y quedan muchas otras por explorar. En la Sección 31.7, se trata en detalle el empleo del plásmido Ti como vector en biotecnología de plantas.

✓ 19.21 Revisión de conceptos

La bacteria tumorigénica *Agrobacterium* tiene una relación especial con las plantas superiores. Un plásmido de la bacteria (el plásmido Ti) puede transferir parte de sí mismo al genoma de la planta, dando lugar a la formación de tumores. Al plásmido de los tumores se le ha encontrado también una extensa aplicación en la ingeniería genética de plantas de interés agrícola.

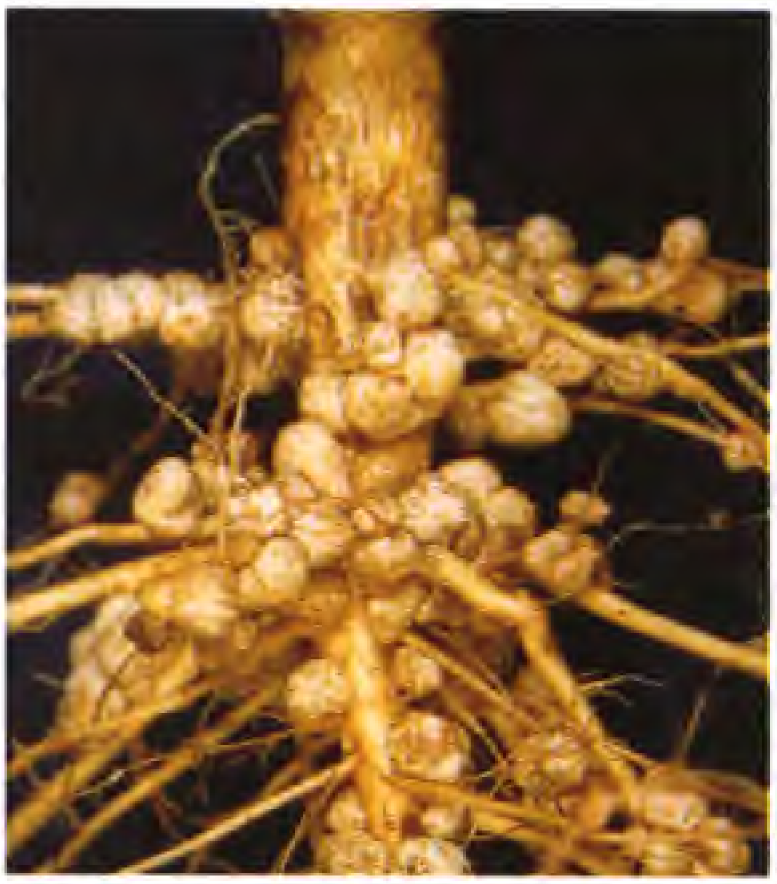
- ✓ ¿Qué son las *opinas* y por qué se producen?
- ✓ ¿En qué difieren los genes *vir* del *T-DNA* en el plásmido Ti?
- ✓ ¿Cómo ha beneficiado el conocimiento de la enfermedad que provoca las tumoraciones al estudio de la biología molecular de las plantas?

19.22 Bacterias de los nódulos radicales y simbiosis con leguminosas

Una de las interacciones más interesantes y destacadas entre bacterias y plantas son las que se dan entre las leguminosas y las bacterias Gram negativas fijadoras de nitrógeno. Las leguminosas son un grupo amplio, que incluye plantas de importancia económica como la soja, el trébol, la alfalfa, las judías y los guisantes, y se caracterizan por tener las semillas dentro de una vaina. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium* son bacilos móviles Gram negativos. La infección de las raíces de una leguminosa con la especie apropiada de alguno de estos géneros conduce a la formación de **nódulos radicales** (Figura 19.62), que son capaces de convertir el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado, en el proceso llamado *fijación de nitrógeno* (*véase* Sección 17.28). *Azorhizobium*, en cambio, forma nódulos tanto en las raíces como en los tallos. La fijación de nitrógeno por la simbiosis leguminosa-*Rhizobium* tiene una gran importancia en agricultura porque causa un aumento significativo del nitrógeno combinado en el suelo. Dado que los suelos desnudos y sin abonar suelen ser deficientes en nitrógeno, las leguminosas noduladas ofrecen una ventaja selectiva en tales condiciones y pueden crecer bien en zonas donde no lo harían otras plantas (Figura 19.63).

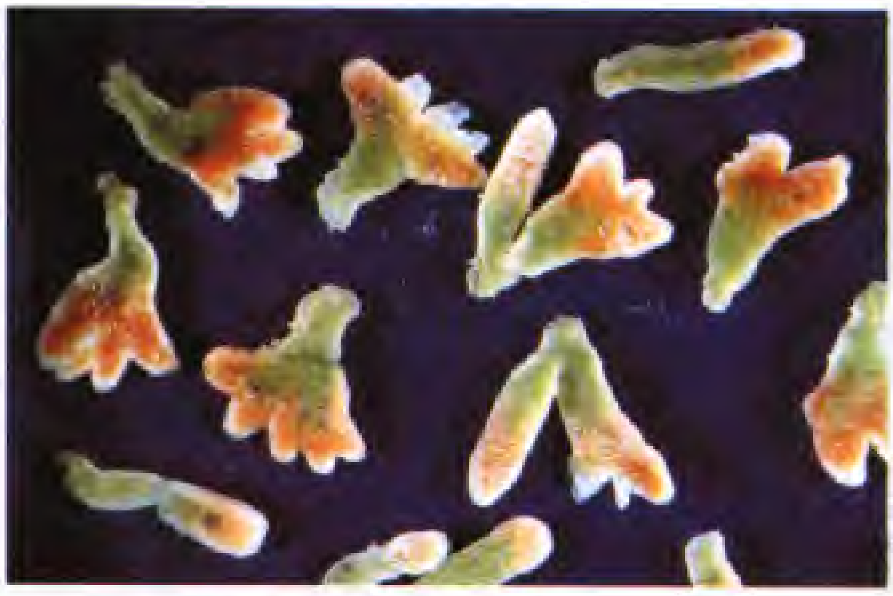
Leghemoglobina y grupos de inoculación cruzada

En condiciones normales, ni las leguminosas ni *Rhizobium* pueden fijar nitrógeno. Sin embargo, la interacción entre ambos organismos posibilita la fijación de nitrógeno. En



Joe Burton

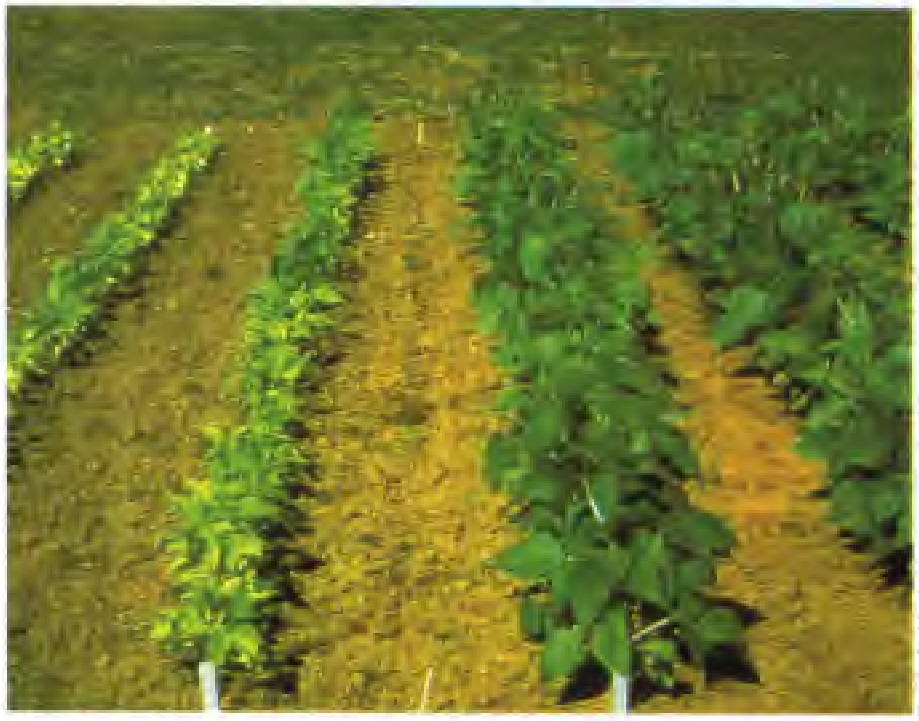
Figura 19.62 Nódulos radicales de la soja. Los nódulos se desarrollan por infección de *Bradyrhizobium japonicum*.



Joe Burton

Figura 19.64 Secciones de nódulos radicales de la leguminosa *Coronilla varia*, mostrando el pigmento rojizo leghemoglobina.

cultivo axénico, *Rhizobium* puede fijar N_2 sólo si se cultiva en condiciones *microaerofílicas* estrictamente controladas. Aparentemente, *Rhizobium* necesita algo de O_2 para generar energía para la fijación del N_2; sin embargo, su nitrogenasa (como la de otros organismos fijadores de nitrógeno, *véase* Sección 17.28) es inactivada por el O_2. En el nódulo, las concentraciones exactas de O_2 están controladas por la **leghemoglobina**, que es una proteína que se une al O_2. Es una proteína de color rojo que contiene hierro y que está siempre presente en nódulos sanos fijadores de N_2 (Figura 19.64). Ni las plantas ni *Rhizobium* pueden sintetizarla de manera independiente, pero se supone que su formación es inducida por la interacción de ambos organismos. La leghemoglobina funciona como un «tampón de oxígeno», cuyo ciclo va de la forma oxidada del hierro (Fe^{3+}) a la reducida (Fe^{2+}) para mantener la concentración de O_2 en el interior del nódulo baja, pero constante. En el interior del nódulo, la relación entre el O_2 ligado a la leghemoglobina y el O_2 libre es del orden de 10.000:1.



Ben B. Bohlool

Figura 19.63 Plantas de soja sin nódulos (izquierda) y con nódulos (derecha), creciendo en un suelo pobre en nitrógeno.

Aproximadamente, el 90% de las especies de plantas leguminosas pueden llegar a formar nódulos, aunque existe una especificidad marcada entre las especies de leguminosa y las cepas de *Rhizobium*. Cada cepa de esta bacteria puede, por lo general, infectar a ciertas especies de leguminosas y no a otras. Se denomina grupo de inoculación cruzada a todo grupo de cepas de *Rhizobium* que puede infectar a un grupo de especies próximas de leguminosas. La Tabla 19.8 muestra los principales grupos de inoculación cruzada de rizobios. El que una cepa de *Rhizobium* pueda infectar a una determinada leguminosa no siempre determina la aparición de nódulos fijadores de nitrógeno. Las cepas que son *inefectivas* forman nódulos de menor tamaño, de color verde blancuzco y sin capacidad de fijar nitrógeno. Por otra

TABLA 19.8 Principales grupos de inoculación cruzada de leguminosas

Planta hospedadora	Nódulos producidos por
Guisante	*Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*[a]
Judía	*Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*[a]
Judía	*Rhizobium tropici*
Loto	*Mesorhizobium loti*
Trébol	*Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*[a]
Alfalfa	*Sinorhizobium meliloti*
Soja	*Bradyrhizobium japonicum*
Soja	*Bradyrhizobium elkanii*
Soja	*Rhizobium fredii*
Sesbania rostrata (leguminosa tropical)	*Azorhizobium caulinodans*

[a] Existen diversas variedades (biovares) de *Rhizobium leguminosarum*; cada una capaz de inducir nodulación en una leguminosa diferente.

parte, las cepas *efectivas* forman nódulos mayores, rojizos (Figura 19.64) y fijadores de nitrógeno. La efectividad está determinada por unos genes presentes en la bacteria (*véase* la discusión sobre la *formación* de genes más adelante en esta sección).

Etapas de la formación de nódulos

Actualmente se conocen bien las etapas de la infección y desarrollo de nódulos radicales (*véase* Figura 19.65). Éstas son:

1. **Reconocimiento** del socio adecuado, tanto por parte de la planta como de la bacteria, y **adherencia** de la bacteria a los pelos radicales.
2. **Excreción** de los factores *nod* por la bacteria.
3. **Invasión** del pelo radical y formación, por parte de la bacteria, de un tubo de infección.
4. **Desplazamiento** hacia la raíz principal a través del tubo de infección.
5. Aparición de células bacterianas deformes, llamadas **bacteroides**, dentro de las células de la planta, y desarrollo del estado de fijación de nitrógeno.
6. Proceso continuado de división de las células bacterianas y vegetales y formación de **nódulo radical** maduro.

Exploraremos ahora con más detalle algunas de estas etapas de la formación de nódulos.

Adherencia e infección

Las raíces de las leguminosas segregan diversos materiales orgánicos que estimulan el crecimiento de una microbiota en la rizosfera. Ese estímulo no es exclusivo de los rizobios; se da también en otras bacterias de la rizosfera. Si en el suelo hay rizobios, se desarrollan en la rizosfera hasta constituir poblaciones muy densas. El primer paso en la formación de los nódulos es la adherencia de la bacteria a la planta en la simbiosis leguminosa-*Rhizobium* (Figura 19.65). En la superficie de todas las especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* se localiza una proteína específica de la adherencia, la *ricadesina*. Capta el calcio y puede actuar uniéndose a los complejos de calcio en la superficie de los pelos radicales. Otras sustancias, como las *lectinas*, que son proteínas que contienen carbohidratos, también cumplen una función en la adherencia planta-bacteria.

Las células de *Rhizobium* penetran en el pelo radical por su extremo. Después de la unión, los pelos radicales se rizan debido a la acción de unas sustancias que excreta la bacteria denominadas *factores nod* (*véase* más adelante). Las bacterias penetran en el pelo radical e inducen en la planta la formación de un tubo de celulosa conocido como **tubo infectivo**, que desciende por el pelo radical. A continuación, la infección alcanza las células de la raíz adyacentes a los pelos radicales y los factores nod estimulan la división de las células vegetales, dando lugar finalmente a la formación del nódulo (Figuras 19.66 y 19.67, *véase* también Figuras19.62 y 19.64).

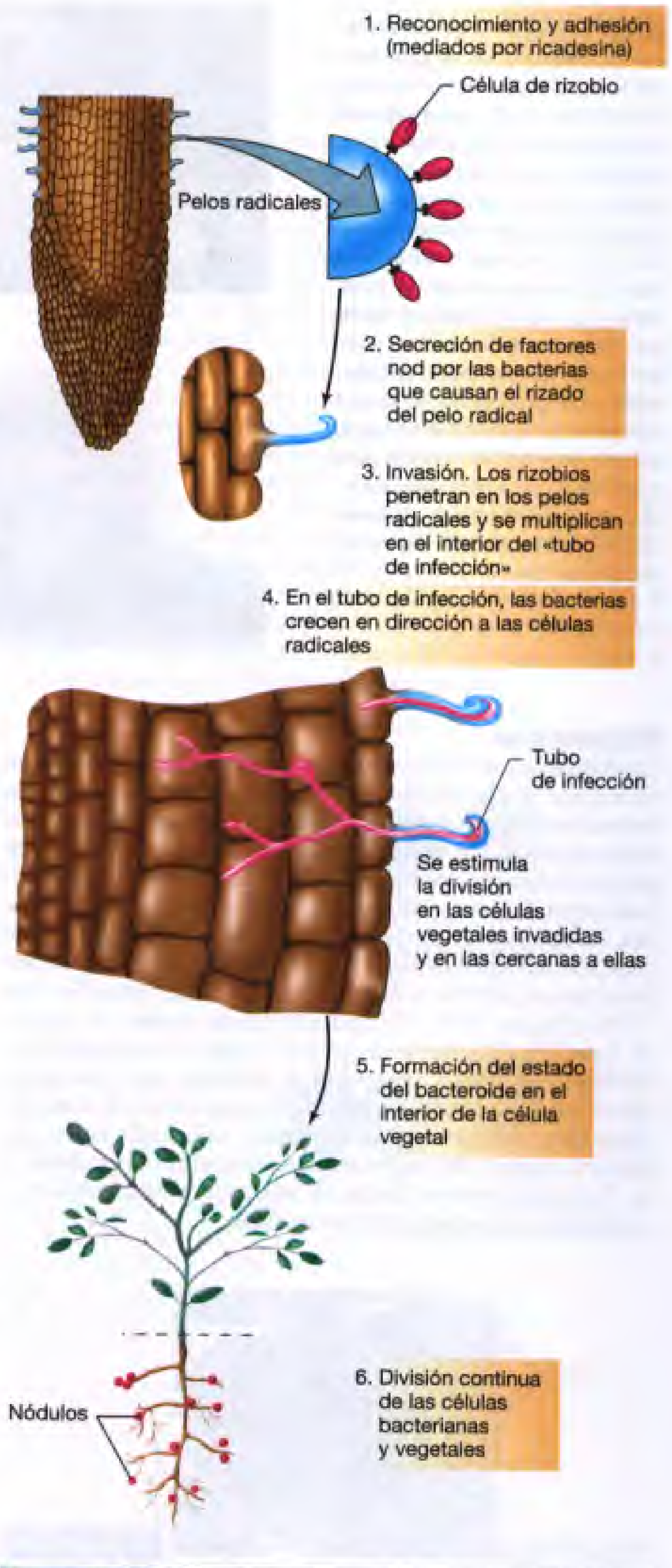
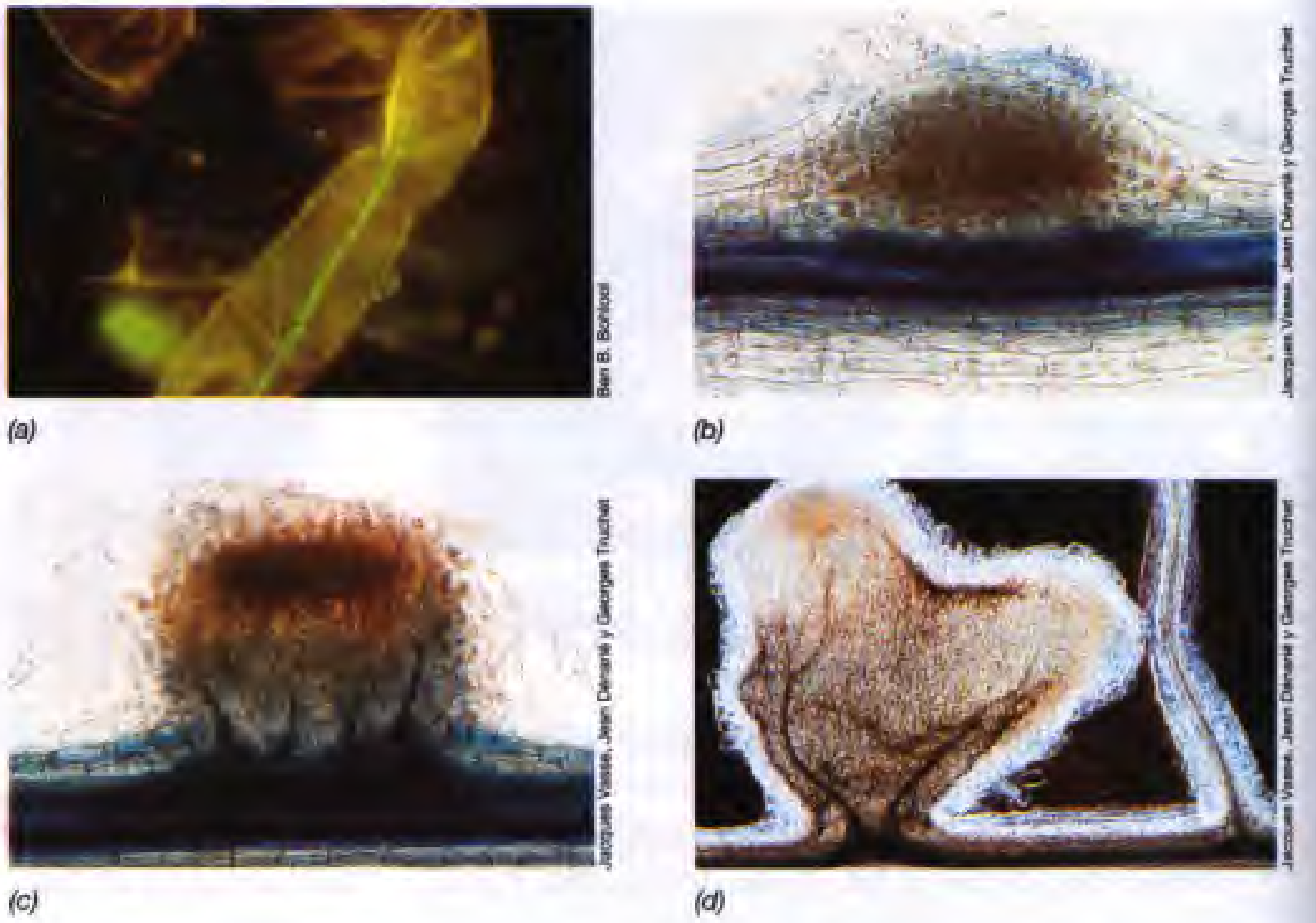

1. Reconocimiento y adhesión (mediados por ricadesina)
Célula de rizobio
Pelos radicales
2. Secreción de factores nod por las bacterias que causan el rizado del pelo radical
3. Invasión. Los rizobios penetran en los pelos radicales y se multiplican en el interior del «tubo de infección»
4. En el tubo de infección, las bacterias crecen en dirección a las células radicales
Tubo de infección
Se estimula la división en las células vegetales invadidas y en las cercanas a ellas
5. Formación del estado del bacteroide en el interior de la célula vegetal
Nódulos
6. División continua de las células bacterianas y vegetales

Figura 19.65 Pasos en la formación de un nódulo radical en una leguminosa infectada por *Rhizobium*. La Figura 19.66*a* muestra una fotomicrografía de una cadena de infección. Las Figuras 19.62 y 19.64 muestran fotografías de nódulos radicales. La formación del estado bacteroide es necesaria para la fijación de nitrógeno.

Figura 19.66 Tubo de infección y formación de nódulos radicales. (a) Tubo de infección formado por células de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* sobre un pelo radical de un trébol blanco (*Trifolium repens*). El tubo de infección consiste en un tubo de celulosa a través del cual se desplazan las bacterias hasta las células de la raíz. (b-d) Nódulos radicales de alfalfa infectada con células de *Sinorhizobium meliloti* en diferentes estadios de desarrollo. La longitud aproximada de las células de *R. leguminosarum* biovar *trifolii* y *Sinorhizobium meliloti* es de 2 μm. Las fotos b-d han sido reproducidas con autorización de *Nature* 351:670-673 (1991). © Macmillan Magazines Ltd.



Ben B. Bohlool

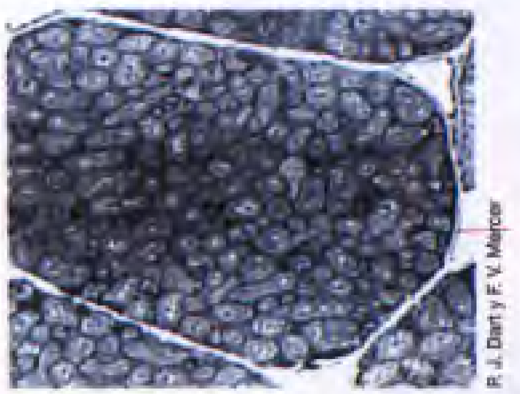
Jacques Vasse, Jean Dénarié y Georges Truchet

Jacques Vasse, Jean Dénarié y Georges Truchet

Jacques Vasse, Jean Dénarié y Georges Truchet

Bacteroides

Las bacterias de *Rhizobium* se multiplican rápidamente en el interior de las células vegetales y se convierten en unas formaciones ramificadas, hinchadas y deformes, llamadas **bacteroides**. Éstos quedan rodeados, individualmente o en pequeños grupos, por porciones de la membrana de la célula vegetal, formando una estructura llamada **simbiosoma**. La fijación de nitrógeno no se inicia hasta que se han formado los simbiosomas. (Los nódulos efectivos pueden detectarse mediante reducción por acetileno, *véanse* Sección 17.28 y Figura 17.71.) Cuando la planta muere, el nódulo se deteriora y las bacterias pasan al suelo. Las formas bacteroidales no tienen capacidad de división, pero los nódulos contienen siempre algunos bacilos en estado de latencia. Estas bacterias proliferan en el suelo, utilizando como nutrientes algunos de los productos del nódulo degradado, y las bacterias pueden iniciar la infección en otras raíces o mantenerse en estado libre en el suelo.



R. J. Dart y F. V. Mercer

Figura 19.67 Sección transversal de un nódulo radical de una leguminosa. La micrografía electrónica de una sección fina muestra una única célula del nódulo de un trébol subterráneo llena de bacterias. Las células de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* miden unos 2 μm de longitud.

Formación de nódulos: genes nod, proteínas nod y factores nod

Los genes que dirigen las etapas específicas de la nodulación de una leguminosa por una cepa de *Rhizobium* se denominan *genes nod* (Figura 19.68). Muchos genes *nod* de diferentes especies de *Rhizobium* están muy bien conservados y se transmiten mediante plásmidos de gran tamaño, denominados *plásmidos Sym*. Además de los genes *nod*, que dirigen el proceso de nodulación, los plásmidos Sym contienen *genes de especificidad*, que restringen una cepa de *Rhizobium* a una determinada planta hospedadora. Es decir, la especificidad del grupo de inoculación cruzada puede transferirse entre especies de rizobio por una simple transferencia del plásmido Sym respectivo.

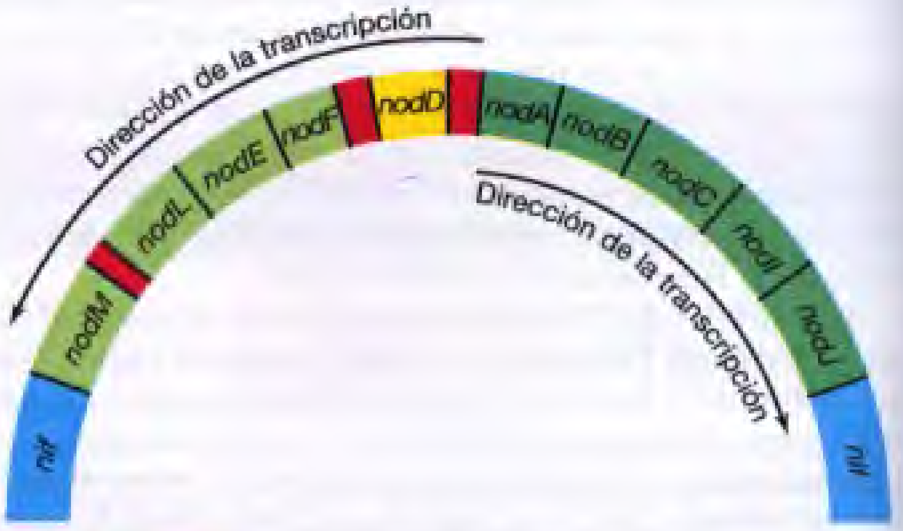
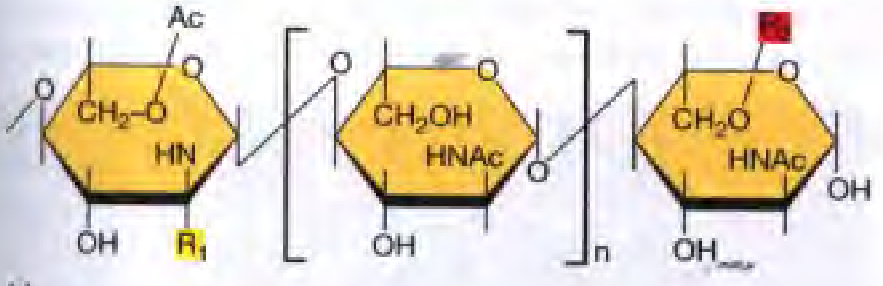


Figura 19.68 Organización de una agrupación de genes *nod* del plásmido Sym de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, la especie que nodula guisantes. El producto de *nodD* controla la transcripción de otros genes *nod*. Las cajas *nod* se destacan en rojo y las flechas indican la dirección de la trasncripción de los genes *nod*. *Véase* el texto para una información más detallada.

En el plásmido Sym de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, los genes *nod* están situados entre dos agrupaciones de genes de fijación de nitrógeno, denominados genes *nif* (*véase* Sección 17.28; en esta especie y en algunas otras especies de *Rhizobium*, los genes *nif* están en plásmidos). La Figura 19.68 muestra la disposición de los genes *nod* en el plásmido Sym de *R. leguminosarum*. En esta especie se han identificado 10 genes *nod*. Se ha logrado secuenciar toda la región *nod* y se conoce la función de muchas de las proteínas Nod. Los genes *nodABC* participan en la producción de oligosacáridos, llamados *factores nod*, que inducen el rizado de los pelos radicales y desencadenan la división de la célula cortical de la planta, lo que determina la formación del nódulo (Figura 19.66). Químicamente, los factores nod consisten en un esqueleto de *N*-acetilglucosamina al cual se unen varios radicales (Figura 19.69). La especificidad del hospedador está determinada por la estructura exacta del factor nod producido por una determinada especie de *Rhizobium*. Por tanto, además de los genes *nodABC*, comunes a todas las especies y cuyos productos sintetizan el esqueleto nod, hay unos genes *nod* propios de cada especie que introducen variaciones químicas en el esqueleto básico del factor nod.

En *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, el gen *nodD* codifica una proteína reguladora, NodD, que controla la transcripción de otros genes *nod* (Figura 19.68). NodF codifica una proteína específica transportadora de grupos acilo que utiliza NodA para acilar el factor nod (Figura 19.69*b*). NodE y NodL participan en la determinación del rango de hospedador (grupos de inoculación cruzada). NodM es una glucosamina sintasa que interviene en la síntesis del factor nod. Y NodI y NodJ son proteínas de membrana que transportan los factores nod al exterior de las células bacterianas.

NodD se une al DNA corriente arriba de los operones estructurales del gen *nod* (regiones que se denominan *cajas nod*) y, tras interaccionar con moléculas inductoras, pliegan el DNA en esa región, lo que estimula la transcripción (NodD es, por tanto, un tipo de regulador positivo, *véase* Sección 8.6). Se han identificado varias moléculas inductoras. Las inductoras clave son *flavonoides* vegetales, moléculas orgánicas complejas que son producidas por plantas y se encuentran ampliamente distribuidas (Figura 19.70*a* y *b*). Los flavonoides tienen muchas funciones en las plantas, como la regulación del crecimiento, la atracción de los animales polinizadores y el control de plagas. Sin embargo, las leguminosas se salen de lo usual porque, a diferencia de otras plantas, sus *raíces* segregan grandes cantidades de flavonoides, presumiblemente para desencadenar la expresión del gen *nod* en los rizobios que se encuentran en el suelo cerca de la planta. Es interesante notar que algunos flavonoides cuya estructura es muy parecida a la de los inductores *nodD* (Figura 19.70*c*) en vez de acelerar, *inhiben* la inducción de los genes *nod* en determinadas especies de rizobios. Esto sugiere que una parte de la especificidad observada entre la planta y la bacteria en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa podría depender de la naturaleza química de los flavonoides excretados por una determinada planta.

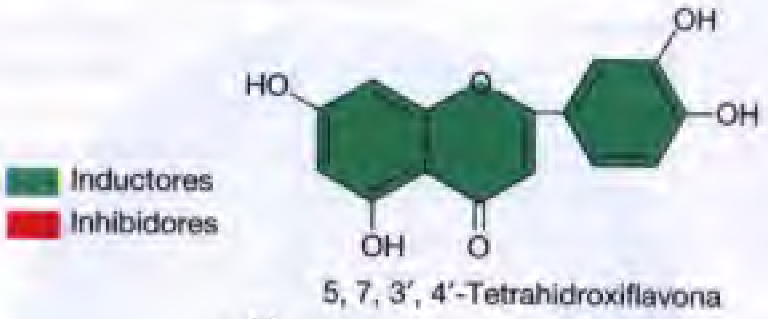


(a)

Especies	R_1	R_2
Sinorhizobium meliloti	C16 : 2 or C16 : 3	SO_3^{2-}
Rhizobium leguminosarum biovar *viciae*	C18 : 1 or C18 : 4	H or Ac

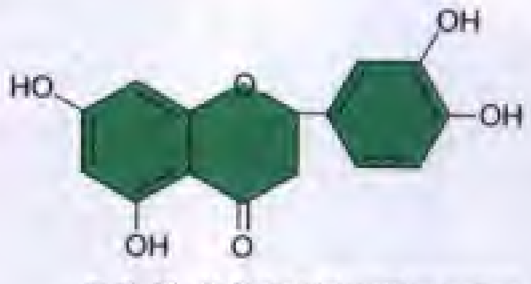
(b)

Figura 19.69 Factores Nod. (a) Estructura general del factor nod producido por *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* y (b) tabla de las diferencias estructurales (R_1, R_2) que definen el factor nod concreto de cada especie. La unidad hexosa central se puede repetir hasta tres veces. C16:2, ácido palmítico con dos enlaces dobles; C16:3, ácido palmítico con tres dobles enlaces; C18:1, ácido oleico con un doble enlace; C18:4, ácido oleico con cuatro dobles enlaces; Ac, acetilo.



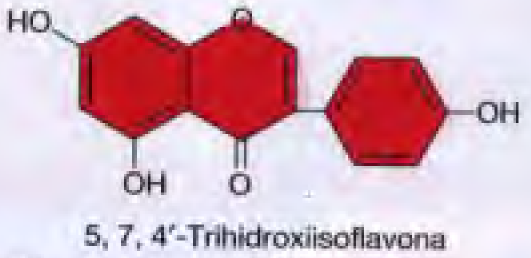
5, 7, 3′, 4′-Tetrahidroxiflavona

(a)



5, 7, 3′, 4′-Tetrahidroxiflavonona

(b)



5, 7, 4′-Trihidroxiisoflavona

(c)

Figura 19.70 Estructura de moléculas flavonoides que inducen (a, b) e inhiben (c) la expresión del gen *nod* en *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. Nótese la semejanza estructural de las tres moléculas. El nombre común de la estructura que se muestra en (a) es *luteolina* y es un derivado flavónico. La estructura (b) se llama *eridictiol* y es químicamente una flavanona. La estructura en (c) se llama *genisteína* y es un derivado isoflavónico.

Bioquímica de la fijación de nitrógeno en los nódulos

Como se ha tratado en la Sección 17.28, en la fijación del nitrógeno interviene la enzima **nitrogenasa**, una proteína de gran tamaño con dos componentes y que contiene hierro y molibdeno. La nitrogenasa de los nódulos radicales posee características similares a la enzima de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, como la sensibilidad al O_2 y la capacidad de reducir acetileno y N_2 (*véase* Figura 17.71). La nitrogenasa está localizada en el interior de los bacteroides y no es liberada al citosol de la célula vegetal.

Los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para la fijación del nitrógeno. Los principales compuestos orgánicos transportados al interior de los bacteroides a través de la membrana del simbiosoma son los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, en particular los ácidos de cuatro carbonos *succinato, malato* y *fumarato* (Figura 19.71). Estos ácidos son utilizados como donadores de electrones para la producción de ATP y, después de su conversión en piruvato, como última fuente de electrones para la reducción del N_2 (*véase* Figura 17.70).

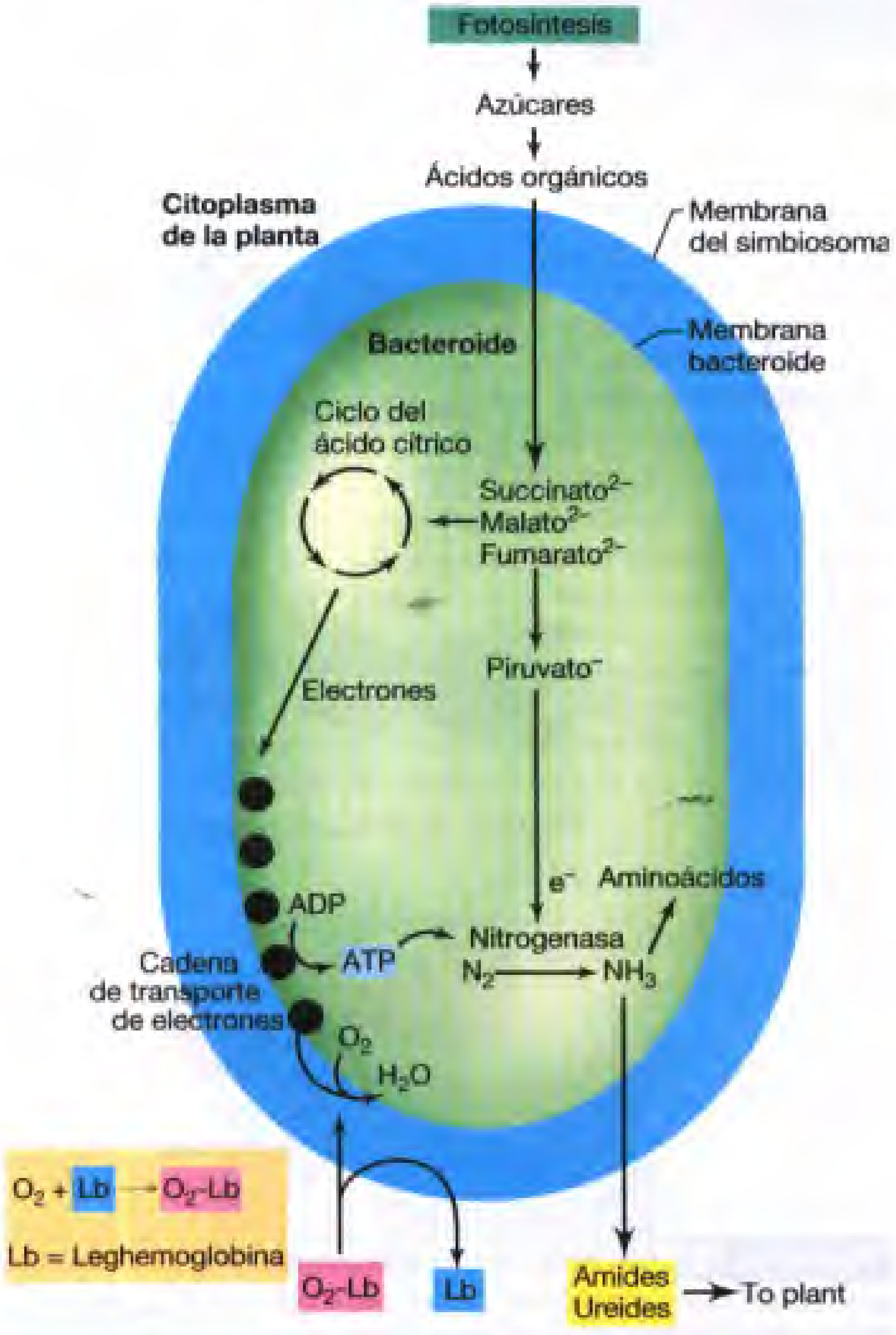


Figura 19.71 Diagrama esquemático de las principales reacciones metabólicas y de intercambio de nutrientes que tienen lugar en los bacteroides. El simbiosoma es una colección de bacteroides rodeados por una membrana originada a partir de la planta.

El primer producto estable que se obtiene en la fijación del N_2 es el *amoníaco*, y varios tipos de pruebas indican que la asimilación del amoníaco para formar compuestos de nitrógeno orgánico en los nódulos radicales la lleva a cabo principalmente la planta. Aunque los bacteroides puedan asimilar algo de amoníaco y formar compuestos orgánicos, poseen unos niveles muy bajos de enzimas asimiladoras de amoníaco. En cambio, la enzima *glutamina sintetasa*, que asimila amoníaco (*véase* Figura 5.15*b*), está presente en elevadas concentraciones en el citoplasma de la célula vegetal. Por tanto, el amoníaco transportado desde el bacteroide a la célula vegetal puede ser asimilado por la planta en forma del aminoácido *glutamina*. Además de glutamina, otros compuestos nitrogenados, especialmente otras amidas aminoácidos, como la asparragina y la 4-metilglutamina, y los ureidos *alantoína* y *ácido alantoico*, son sintetizados por la planta y transportados luego a los tejidos vegetales (*véase* Figura 19.71).

Rizobios formadores de nódulos en el tallo y otras asociaciones con rizobios

Aunque en la mayoría de las leguminosas los nódulos fijadores de nitrógeno se forman en las *raíces*, algunas especies los poseen en los *tallos*. Son plantas que abundan en regiones tropicales, con suelos a menudo pobres en nitrógeno debido al lixiviado y a la intensa actividad biológica. El principal sistema formador de nódulos en el tallo con que se ha experimentado es el constituido por la leguminosa *Sesbania* y la bacteria *Azorhizobium caulinodans* (Figura 19.72). Los nódulos del tallo normalmente se forman en la porción que queda sumergida o justo por encima del nivel del agua (Figura 19.72). Los estudios llevados a cabo indican que la secuencia general de etapas

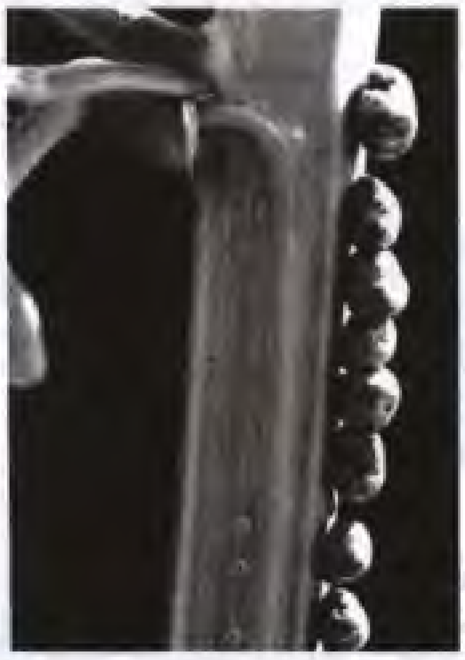

B. Dreyfus

Figura 19.72 Nódulos del tallo causados por *Azorhizobium*. La fotografía muestra el tallo de la leguminosa tropical *Sesbania rostrata*. En la parte izquierda del tallo aparecen lugares sin inocular, mientras que idénticos lugares del lado derecho están inoculados por los rizobios formadores de nódulos.

en la formación de este tipo de nódulos es muy parecida a la de los nódulos radicales. Aparece un tubo infectivo y la formación del bacteroide precede al estado de fijación del N_2.

Un hallazgo curioso es que algunos rizobios formadores de nódulos en el tallo producen bacterioclorofila *a* y pueden, por tanto, llevar a cabo la fotosíntesis anoxigénica (*véase* Sección 17.4). Los rizobios que contienen bacterioclorofila, agrupados en el género *Photorhizobium*, son frecuentes en la naturaleza, especialmente asociados a leguminosas tropicales, en las cuales la luz aportaría al menos una parte de la energía necesaria para el proceso de fijación de N_2 por la bacteria.

Se ha encontrado un tercer hábitat, además del suelo y de los nódulos radicales de tréboles, para especies de rizobios *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. En los campos donde hay una alternancia anual en el cultivo de arroz y de tréboles tiene lugar una asociación específica entre las raíces del arroz y *R. leguminosarum* biovar *trifolii* (Figura 19.73). En esta asociación, las células de rizobio llevan una existencia *inter*celular dentro de las raíces del arroz y no producen nódulos. Sin embargo, en las plantas de arroz donde se ha dado esa asociación bacteriana el crecimiento es más rápido y la producción mayor que en las que no ha tenido lugar. Es interesante notar que no hay fijación de nitrógeno. En su lugar parece que el beneficio para la planta consiste en una mejora en la incorporación de nutrientes, la relación con el agua y factores relacionados.

Importancia agrícola de la simbiosis entre *Rhizobium* y plantas leguminosas

La asociación *Rhizobium*-leguminosas constituye una auténtica simbiosis, ya que claramente hay una participación de cada miembro. La fijación de nitrógeno beneficia a la planta que crece en suelos pobres en ese elemento, mientras que para los rizobios el nódulo es un ambiente que protege y nutre. Ningún otro ejemplo en microbiología muestra una relación beneficiosa bacteria/planta tan bien desarrollada ni tan bien entendida como la simbiosis leguminosa/nódulo radical. Y las ventajas para la agricultura son enormes, si se piensa en los más de 120 millones de toneladas de nitrógeno atmosférico que anualmente son fijadas a amoníaco biológicamente. Las plantas que aparecen en la Tabla 19.8 incluyen la soja y la alfalfa, que son esenciales en la industria del procesado de la soja y en la alimentación animal (heno de alfalfa), respectivamente. También se incluyen judías y guisantes que son especies vegetales muy importantes en la nutrición humana. Muchas industrias agrícolas dependen de la cosecha de leguminosas, cuya capacidad de crecer sin abonos nitrogenados hace que anualmente puedan ahorrarse millones de dólares en abonos.

Simbiosis fijadoras de nitrógeno en plantas no leguminosas

Existen otras simbiosis fijadoras de nitrógeno en las cuales intervienen plantas no leguminosas y microorganismos distintos a los rizobios. Hay cianobacterias fijadoras de nitrógeno que establecen simbiosis con diferentes plantas. El helecho acuático *Azolla* contiene dentro de pequeños poros de sus frondes la cianobacteria con heterocistos *Anabaena azollae* (Figura 19.74). *Azolla* se ha usado durante siglos para enriquecer los arrozales. Antes de plantar el arroz, los agricultores dejan que *Azolla* crezca en los arrozales hasta formar una abundante capa vegetal. A medida que el arroz crece, va cubriendo la mezcla *Azolla-Anabaena*. Las plantas de *Azolla* mueren y el nitrógeno es liberado y asimilado

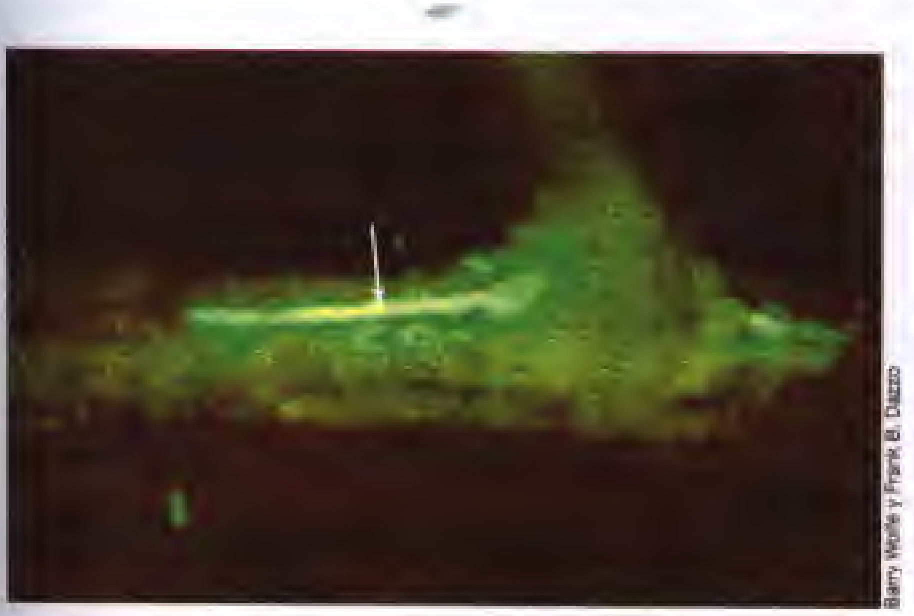
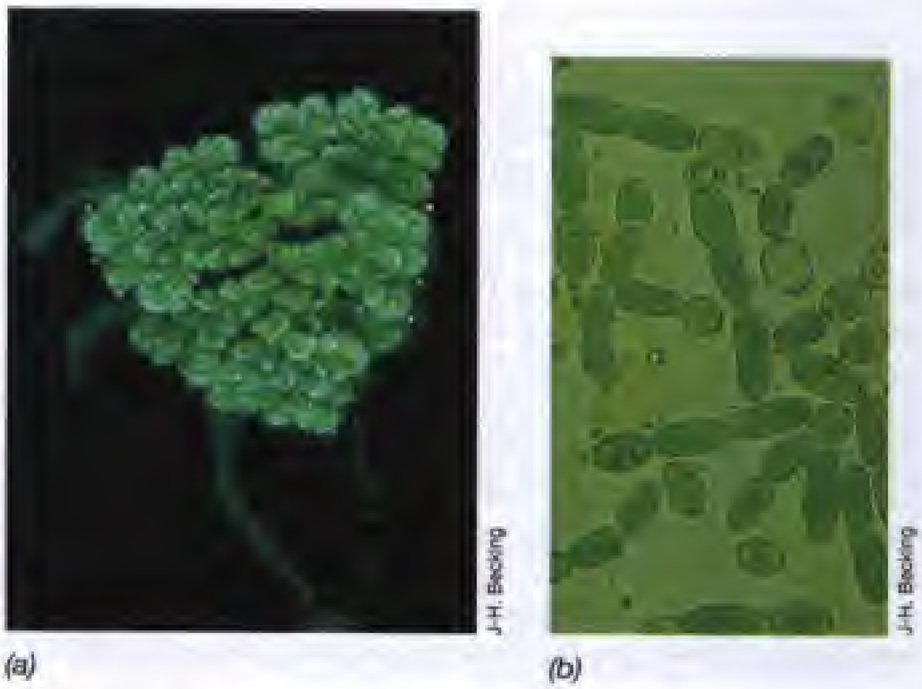

Barry Wolfe y Frank B. Dazzo

Figura 19.73 *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* y raíces de arroz. Fotomicrografía de flurorescencia de células de rizobio (flechas) que contienen proteínas de color verde fluorescente (*véase* Sección 18.3) adheridas y distribuidas por las raíces de la planta de arroz. Aunque no penetran en las células de la planta y fijan nitrógeno como en la simbiosis de los nódulos radicales, las plantas de arroz asociadas a *R. leguminosarum* biovar *trifolii* son más fuertes y crecen más rápidamente que las que no muestran esta asociación.



J-H. Becking

J-H. Becking

Figura 19.74 Simbiosis de *Azolla-Anabaena*. (*a*) Asociación intacta que muestra una sola planta de *Azolla pinnata*. El diámetro de la planta es de aproximadamente 1 cm. (*b*) La cianobacteria simbionte *Anabaena azollae*, tal como se observa en las hojas trituradas de *A. pinnata*. Las células individuales de *Anabaena azollae* tienen aproximadamente de 5 µm de ancho. Se pueden observar heterocistos ovalados (de color más claro) donde tiene lugar la fijación de nitrógeno en la cianobacteria (*véanse* Sección 12.26 y Figura 12.80).

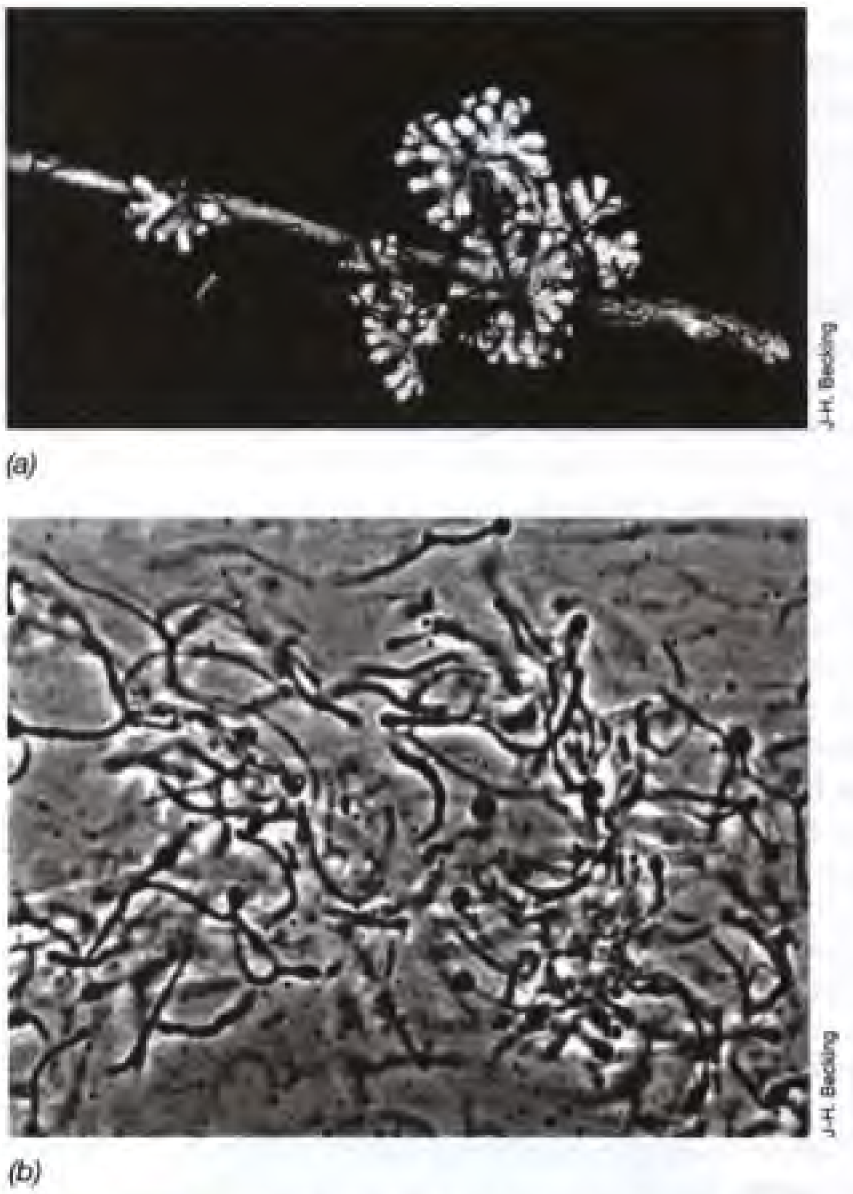


Figura 19.75 Nódulos y células de *Frankia*. *(a)* Nódulos radicales del aliso común *Alnus glutinosa*.*(b)* Cultivo de *Frankia* purificado procedente de nódulos de *Comptonia peregrina*. Se aprecian las vesículas (estructuras esféricas) en las puntas de los filamentos de las hifas.

posteriormente por las plantas de arroz. La repetición de este proceso en cada cosecha permite obtener una alta producción de arroz sin necesidad de usar abonos nitrogenados.

El aliso (género *Alnus*) tiene nódulos radicales fijadores de nitrógeno (*véase* Figura 19.75). Dichos nódulos albergan un estreptomiceto fijador de nitrógeno denominado *Frankia*. Aunque en extractos celulares la nitrogenasa de *Frankia* es sensible al oxígeno molecular, como las células intactas de *Azotobacter* (*véase* Sección 12.9), las células intactas de *Frankia* fijan N_2 en presencia de tensiones de oxígeno elevadas. Esto se debe a que *Frankia* protege su nitrogenasa situándola en un extremo hinchado de las células, que se conoce como *vesícula* (*véase* Figura 19.75*b*). Las vesículas tienen unas paredes gruesas que retardan la difusión del O_2 y que mantienen la tensión de O_2 en su interior a niveles compatibles con la actividad de la nitrogenasa. En ese aspecto, las vesículas de *Frankia* se parecen a los heterocistos producidos por algunas cianobacterias filamentosas, porque son sitios localizados de fijación de N_2 (*véanse* Figura 19.74*b*, Sección 12.25 y Figura 12.80).

El aliso es un pionero característico en la colonización de suelos desnudos y pobres en nutrientes, probablemente debido a su capacidad de establecer relaciones simbióticas con *Frankia* para fijar nitrógeno. *Frankia* también forma nódulos en algunas plantas leñosas de menor tamaño. A diferencia de lo que ocurre en la relación *Rhizobium*-leguminosa, en *Frankia* una sola cepa puede formar nódulos en varias especies distintas de plantas, lo cual indica una simbiosis menos específica.

Azospirillum lipoferum es una bacteria fijadora de N_2 que vive en una asociación casual con raíces de hierbas tropicales. Se encuentra en la rizosfera, donde se alimenta de productos excretados por las raíces. Puede crecer también alrededor de raíces de plantas cultivadas, como el maíz (*Zea mays*). La inoculación del maíz con *A. lipoferum* puede originar un ligero aumento (aproximadamente el 10%) del rendimiento de esta planta. En la caña de azúcar, el organismo *Acetobacter diazotrophicus* crece en el tejido vascular de la planta y fija cantidades sustanciales de N_2. Esta planta necesita para su crecimiento una elevada concentración de sacarosa, lo que hace pensar que la asociación planta-bacteria en este caso está más desarrollada que la de *Azospirillum*. Es probable que entre bacterias y plantas se den muchas asociaciones ocasionales o bien establecidas, aunque únicamente se han hallado pruebas directas de una relación simbiótica en el caso de *Rhizobium* y *Frankia*.

✓ 19.22 Revisión de conceptos

Una de las simbiosis planta-microbio más extendidas e importantes es la existente entre leguminosas y algunas bacterias fijadoras de nitrógeno. Las bacterias inducen la formación de nódulos radicales, en cuyo interior se produce la fijación de nitrógeno. La planta proporciona la fuente de energía orgánica que necesitan las bacterias de los nódulos y las bacterias el nitrógeno fijado para el crecimiento de la planta. Las bacterias de los nódulos desempeñan una importante función en la agricultura porque numerosas plantas de consumo son legumbres (alfalfa, trébol, soja, guisantes y muchas más).

- ✓ ¿Cuáles son los efectos de los factores nod sobre la planta?
- ✓ ¿Qué es la *leghemoglobina* y cuál es su función?
- ✓ ¿Qué es un *bacterioide* y qué ocurre en su interior?
- ✓ ¿Cuáles son las principales semejanzas y diferencias entre *Rhizobium* y *Frankia*?

Preguntas de repaso

1. ¿Por qué de una misma muestra de suelo se pueden aislar tanto bacterias *anaerobias* como *aerobias* estrictas?
2. Elabórese una lista con los *recursos* esenciales que necesitan los microorganismos para prosperar en sus hábitat. Y también de las *condiciones* esenciales.
3. La superficie de una roca en una corriente de agua suele contener un biofilme. ¿Qué ventaja(s) tiene para una bacteria desarrollarse sobre el biofilme en comparación con su crecimiento en la corriente?
4. ¿De qué forma los biofilmes pueden complicar el tratamiento de las enfermedades infecciosas?
5. ¿De qué forma un aporte de materia orgánica, por ejemplo de aguas residuales, afecta al contenido de O_2 en un río o corriente de agua?
6. Suponiendo que la proteorrodopsina sea un análogo funcional de la bacteriorrodopsina, descríbase cómo esta molécula puede beneficiar a una célula que vive en un medio muy pobre en materia orgánica, como por ejemplo el mar abierto. (Es conveniente consultar las Secciones 12.2 y 17.1 antes de contestar.)
7. ¿Cuál es la diferencia entre bacterias *barotolerantes* y *barofílicas*? ¿Y entre estos dos grupos y los *barófilos extremos*? ¿Qué propiedades tienen en común las bacterias barotolerantes, barofílicas y barofílicas extremas?
8. ¿Qué indicios procedentes de las fuentes hidrotermales apoyan la idea de que los procariotas crecen a temperaturas extremadamente altas? A partir de los datos de la Tabla 6.1, dígase por qué el gusano marino *Alvinella* tiene interés para los microbiólogos.
9. ¿Cómo pueden organismos como *Syntrophobacter* y *Syntrophomonas* crecer cuando su metabolismo se basa en reacciones desfavorables termodinámicamente? ¿Cómo se cultivan estos organismos en el laboratorio?
10. ¿Por qué es la reducción de sulfato la forma principal de respiración anaeróbica en ambientes marinos, mientras que la metanogénesis domina en aguas dulces? ¿Se produce algún tipo de metanogénesis en ambientes marinos? Si es así, ¿cómo se produce?
11. ¿Qué es el *rumen* y cómo opera el proceso digestivo en los rumiantes? ¿Cuáles son los mayores beneficios e inconvenientes del sistema de los rumiantes? Compárese con la digestión en el intestino ciego de ciertos animales.
12. ¿Por qué pueden ser la urea o el amoníaco fuentes de nitrógeno para los rumiantes y no para los humanos?
13. Compárense los procesos de *nitrificación* y *desnitrificación* en relación con los organismos que intervienen, las condiciones ambientales que favorecen cada proceso y los cambios en la disponibilidad de nutrientes.
14. ¿Qué organismos intervienen en el reciclado anóxico de los compuestos de azufre? Si los quimiolitotrofos del azufre no se hubieran desarrollado nunca, ¿sería un problema el reciclado de los compuestos de azufre? ¿Qué compuestos *orgánicos* de azufre son interesantes en la naturaleza?
15. ¿Por qué la mayoría de los oxidadores de hierro son aerobios estrictos y por qué son acidófilos?
16. ¿Cómo pueden las reacciones químicas espontáneas acidificar una pila de carbón y cómo se continúa después la producción de ácido gracias a las reacciones químicas y a la acción de *Thiobacillus ferrooxidans*?
17. ¿En qué forma es útil *Thiobacillus ferrooxidans* en la extracción del mineral de cobre? ¿Qué paso crucial en su oxidación indirecta realiza *T. ferrooxidans*? ¿Cómo se recupera el cobre de las disoluciones producidas por la lixiviación?
18. ¿Cómo se detoxifica el mercurio por el sistema del operón *mer*?
19. ¿Qué condiciones físicas y químicas son necesarias para la biodegradación rápida del petróleo en ambientes acuáticos? Diséñese un experimento que indique qué condiciones son las mejores para el proceso de oxidación del petróleo.
20. ¿Qué son los *compuestos xenobióticos* y cuáles serían las dificultades de los microorganismos para catabolizarlos?
21. ¿Cómo contribuyen las decloraciones reductivas a resolver los problemas de contaminación?
22. Descríbase las propiedades químicas del «plástico microbiano».
23. Compárese la producción del tumor de una planta por *Agrobacterium tumefaciens* y la de un nódulo radical por especies de *Rhizobium*. ¿Cuáles son las semejanzas y diferencias de estas estructuras? ¿Qué importancia tienen los plásmidos en su desarrollo?
24. ¿Qué información genética tiene el plásmido Ti? ¿Qué gen(es) podría(n) eliminarse de Ti sin afectar a la capacidad de originar tumores?
25. ¿Qué ventajas ecológicas poseen las plantas leguminosas sobre las no leguminosas?
26. ¿Qué sustancias de origen vegetal presentes en los nódulos radicales de las leguminosas son necesarias para que el simbionte rizobiano fije nitrógeno?
27. Descríbanse los pasos en el desarrollo de los nódulos radicales de una leguminosa. ¿Cuál es la naturaleza del reconocimiento entre la planta y la bacteria? Compárese con el reconocimiento en el sistema *Agrobacterium*-planta.
28. ¿De qué forma el nitrógeno fijado por *Rhizobium* se incorpora a las proteínas de la planta?
29. Descríbanse los operones *nod* de una especie típica de *Rhizobium*, como *R. leguminosarum*. Explíquese la regulación de los genes *nod*. ¿Qué son los factores Nod y qué hacen?

Ejercicios prácticos

1. Compárese un ecosistema lacustre con una fuente hidrotermal submarina. ¿Cómo llega la energía a cada ecosistema? ¿Cuál es la base de la producción primaria en cada uno de ellos? ¿Qué tipos nutricionales de organismos existen en cada ecosistema y cómo se alimentan?
2. Supongamos una planta depuradora que libera aguas residuales con altos niveles de amoníaco y fosfato, pero muy poco carbono orgánico. ¿Qué tipo de organismos proliferarían en estas condiciones? ¿Cómo variaría el contenido de oxígeno en el punto de vertido y aguas abajo respecto al mostrado en la Figura 19.10*a*?
3. Tomemos los datos de la Figura 19.13. Considerando que en el mar abierto las aguas son muy óxicas, ¿qué se puede predecir de los posibles estilos de vida metabólicos de *Archaea* y *Bacteria*? ¿Por qué un grupo puede tener proteorrodopsina pero el otro no?
4. Los gusanos tubícolas de las fuentes hidrotermales han sido denominados también «animales autotróficos». ¿Qué simbiosis tiene lugar en estos animales y por qué la denominación mencionada tiene algo de verdad, aunque técnicamente sea incorrecta?
5. Se añade celulosa marcada con ^{14}C a un vial que contiene una pequeña cantidad de lodo residual y se sella en condiciones anóxicas. Pocas horas después aparece $^{14}CH_4$ en el vial. Discútase el proceso que ha llevado a este resultado.
6. Supóngase que se ha descubierto un nuevo animal cuya dieta es únicamente a base de hierba. Usted cree que es un rumiante y dispone de un espécimen sobre el que realizar un examen anatómico. Si el animal es un rumiante, descríbase la posición y los componentes básicos del aparato digestivo y los microorganismos y sustancias clave que esperaría encontrar.
7. El drenaje ácido de las minas es un proceso en parte químico y en parte biológico. Coméntese la química y microbiología de esos procesos, destacando las reacciones clave que son biológicas.
8. Compárense los procesos en los que las bacterias interaccionan con las plantas en enfermedades como la agalla del tallo y en los nódulos radicales. ¿Qué paralelismos y diferencias hay en ambos procesos? En este último caso, destáquese qué es lo que realmente *entra* en la planta.

El control del crecimiento de los microorganismos es uno de los principales objetivos de los microbiólogos experimentales y clínicos, así como la actividad cotidiana en el hogar, hospitales, restaurantes y allí donde se requiera higiene. Existen varios métodos físicos y químicos para el control microbiano, tales como desinfectantes y antisépticos y, para uso *in vivo*, fármacos antimicrobianos muy activos. No obstante, la mejor forma de controlar el crecimiento microbiano es la esterilización con métodos físicos como el vapor a presión y calor en el autoclave, tal como se muestra aquí.

20

CONTROL DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

I CONTROL FÍSICO ANTIMICROBIANO 689
20.1 Esterilización por calor 689
20.2 Esterilización por radiación 692
20.3 Esterilización por filtración 694

II CONTROL QUÍMICO ANTIMICROBIANO 696
20.4 Control químico del crecimiento 696
20.5 Antisépticos, desinfectantes y esterilizantes 698

III AGENTES ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS *IN VIVO* 699
20.6 Antimicrobianos sintéticos 701
20.7 Antimicrobianos naturales: antibióticos 704
20.8 Antibióticos β-lactámicos: penicilinas y cefalosporinas 705
20.9 Antibióticos producidos por procariotas 707

IV CONTROL DE VIRUS Y DE PATÓGENOS EUCARIÓTICOS 708
20.10 Antivíricos 708
20.11 Antifúngicos 710

V RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS Y DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS ANTIMICROBIANOS 711
20.12 Resistencia a antimicrobianos 711
20.13 Búsqueda de nuevos antimicrobianos 715

Glosario

Agente antimicrobiano un compuesto químico que mata o inhibe el crecimiento de los microorganismos

Agente bactericida un agente que mata las bacterias

Agente bacteriostático agente que inhibe el crecimiento bacteriano

Agente fungicida un agente que mata hongos

Agente fungistático un agente que inhibe el crecimiento de los hongos

Agente quimioterapéutico un agente antimicrobiano que puede usarse por vía interna

Agente virucida un agente que detiene la replicación vírica y la actividad

Agente virustático un agente que inhibe la replicación vírica

Aminoglicósidos un grupo de antibióticos, entre los que se incluye la estreptomicina, que contiene aminoazúcares unidos por uniones glicosídicas

Análogo de un factor del crecimiento un agente químico que es análogo de un factor de crecimiento y bloquea su incorporación

Antibiótico sustancia química producida por un microorganismo que mata o inhibe el crecimiento de otro microorganismo

Antibiótico de amplio espectro un antibiótico que actúa tanto sobre microorganismos Gram positivos como sobre Gram negativos del dominio *Bacteria*

Antibióticos β-lactámicos un grupo de antibióticos, entre los que se incluye la penicilina, que contiene el anillo β-lactámico heterocíclico de cuatro átomos

Antiséptico agentes antimicrobianos que son suficientemente poco tóxicos como para ser aplicados a los tejidos vivos

Autoclave un esterilizador que destruye los microorganismos con temperatura y vapor de agua bajo presión

CMI concentración mínima inhibitoria; la concentración mínima de una sustancia necesaria para impedir el crecimiento microbiano

Descontaminación tratamiento que hace que un objeto o superficie inanimada sea manipulable sin riesgo

Desinfección el proceso de eliminación de prácticamente todos los patógenos, pero no todos los microorganismos, de objetos inanimados o de superficies

Esterilización la muerte o eliminación de todos los organismos vivos y sus virus de un medio de crecimiento

Inhibición la reducción del crecimiento microbiano debido a un descenso en el número de microorganismos presentes o alteraciones en el ambiente microbiano

INNTR inhibidor no nucleosídico de la transcriptasa reversa

Interferones proteínas antivíricas específicas del hospedador, que impiden la infección de las células vecinas

INTR inhibidor nucleosídico de la transcriptasa reversa

IP inhibidor de la proteasa

Lisis pérdida de la integridad celular con liberación del contenido citoplasmático

Pasteurización destrucción de todos los microorganismos productores de enfermedades o reducción en el número de microorganismos alterantes

Penicilina semisintética una penicilina natural que ha sido alterada químicamente

Quinolonas compuestos antibacterianos sintéticos que interaccionan con la DNA girasa e impiden el superenrollamiento del DNA bacteriano

Resistencia a un compuesto antimicrobiano la capacidad adquirida de un microorganismo para crecer en presencia de un compuesto antimicrobiano, al que habitualmente el microorganismo es sensible

Tetraciclina un antibiótico caracterizado por un anillo naftaceno de cuatro átomos

---

En este capítulo comenzaremos considerando a los microorganismos desde otra perspectiva. Nos ocuparemos de las relaciones de los microorganismos con el hombre. Empezaremos señalando los agentes y los métodos empleados para el control del crecimiento microbiano.

En general, el control puede efectuarse limitando el crecimiento de los microorganismos, proceso llamado **inhibición**; o destruyendo los organismos por **esterilización**, muerte o eliminación de todos los organismos viables de un medio de cultivo. Los agentes que destruyen o matan las bacterias son **bactericidas**. En la práctica, a menudo la esterilidad no se puede alcanzar, pero en muchos casos podemos inhibir el crecimiento rápido de los microorganismos mediante métodos de descontaminación y desinfección. Los agentes que inhiben el crecimiento bacteriano se dice que son **bacteriostáticos**.

Las medidas de control de los microorganismos son la **descontaminación**, la **desinfección** y la **esterilización**. Continuamente aplicamos los métodos de descontaminación que inhiben el crecimiento microbiano; por ejemplo, el hecho de secar una mesa limpia después de una comida remueve potenciales nutrientes para los microorganismos y los microbios contaminantes, evitando así el crecimiento microbiano. Medidas antimicrobianas más directas son la desinfección con agentes químicos o físicos especiales, con el fin de inhibir el crecimiento microbiano o de destruir los microorganismos; por ejemplo, rutinariamente utilizamos desinfectantes químicos como el alcohol para limpiar y desinfectar las heridas. Finalmente, cuando es necesario, utilizamos métodos de esterilización controlados para destruir todos los microorganismos. La esterilización, aunque es difícil de llevar a cabo, impide completamente la contaminación y el crecimiento de los microorganismos. Tales medidas son necesarias, por ejemplo, cuando se preparan medios de cultivo microbiológicos o instrumentos quirúrgicos. La finalidad de todos estos procedimientos es reducir la *carga microbiana*, o número de microorganismos viables presentes.

Sin embargo, el control *in vivo* de los microorganismos es algo diferente: los agentes bactericidas o bacteriostáticos útiles en la clínica deben reducir o impedir el crecimiento microbiano sin causar daño a la célula del hospedador. Esto se consigue con una gran variedad de agentes quimioterapéuticos naturales y sintéticos.

En este capítulo examinaremos en primer lugar los métodos para el control microbiano que se usan *in vitro*. A continuación estudiaremos los medicamentos antimicrobianos que se usan *in vivo* en el hombre.

I CONTROL FÍSICO ANTIMICROBIANO

Los métodos físicos se usan a menudo para lograr la descontaminación microbiana, la desinfección y la esterilización. El calor, la radiación y la filtración son métodos estándar que se emplean para destruir o eliminar microorganismos no deseables. Aquí hablaremos de los mecanismos de acción de dichos métodos y propondremos algunos ejemplos prácticos que utilizan estos métodos para impedir el crecimiento microbiano, o descontaminar áreas o materiales contaminados con microorganismos.

20.1 Esterilización por calor

Quizá el método más generalizado para el control del crecimiento microbiano sea la aplicación de calor.

Cinética de la esterilización por calor

Para todos los microorganismos existe una temperatura máxima de crecimiento por encima de la cual mueren. A temperaturas muy altas, casi todas las moléculas pierden su estructura y su función, por el proceso denominado *desnaturalización*. Como se muestra en la Figura 20.1, la muerte por desnaturalización es una función exponencial (de primer orden) y ocurre más rápidamente cuanto mayor es la temperatura. La relación de primer orden que se muestra en la Figura 20.1 significa que a cualquier tiempo la tasa de muerte es proporcional a la concentración de microorganismos a ese tiempo; el tiempo para que una fracción determinada de las células (por ejemplo, el 90%) muera es independiente de la concentración inicial. Esto tiene importantes consecuencias prácticas. Si deseamos *esterilizar* una población microbiana, se tardará más a bajas temperaturas que a temperaturas elevadas. Por tanto, es necesario ajustar el tiempo y la temperatura para conseguir la esterilización para cada serie específica de condiciones. El tipo de calor también es importante: el calor húmedo tiene mayor poder de penetración que el calor seco y produce una reducción más rápida del número de organismos vivos a una temperatura determinada.

El tiempo que se requiere para reducir 10 veces la densidad de población a una determinada temperatura, llamado *tiempo de reducción decimal* o *D*, es el parámetro más útil que caracteriza la esterilización por calor. En el margen habitual de temperaturas usado en la preparación de alimentos (por ejemplo, al cocinar o en el enlatado), la relación entre *D* y temperatura es prácticamente exponencial. Así, cuando el logaritmo de *D* se representa frente a la temperatura, se obtiene una línea recta (Figura 20.2). La pendiente de la recta proporciona una medida de la sensibilidad del organismo al calor en las condiciones empleadas, y la gráfica puede usarse para calcular los tiempos del proceso para conseguir la esterilización, como en los tratamientos de productos enlatados (*véase* Sección 29.2).

La determinación de los tiempos de reducción decimal es un proceso relativamente largo y requiere un número considerable de medidas y el contaje de organismos viables (*véase* Sección 6.5). Una manera más fácil de caracterizar la sensibilidad de un organismo al calor es determinar el *tiempo de muerte térmica*, tiempo que se necesita para matar

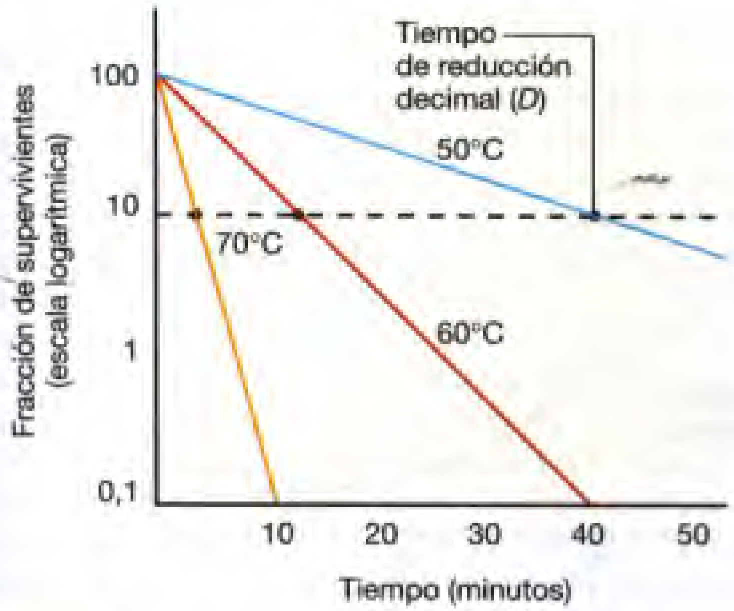


Figura 20.1 Efecto de la temperatura en la viabilidad de una bacteria mesófila. El tiempo de reducción decimal, *D*, se obtuvo para el mismo microorganismo mesófilo a tres temperaturas diferentes. *D* es el tiempo al que únicamente el 10% de la población original de microorganismos permanece viable a dicha temperatura. Para 70°C, *D* = 3 min; para 60°C, *D* = 12 min; para 50°C, *D* = 42 min.

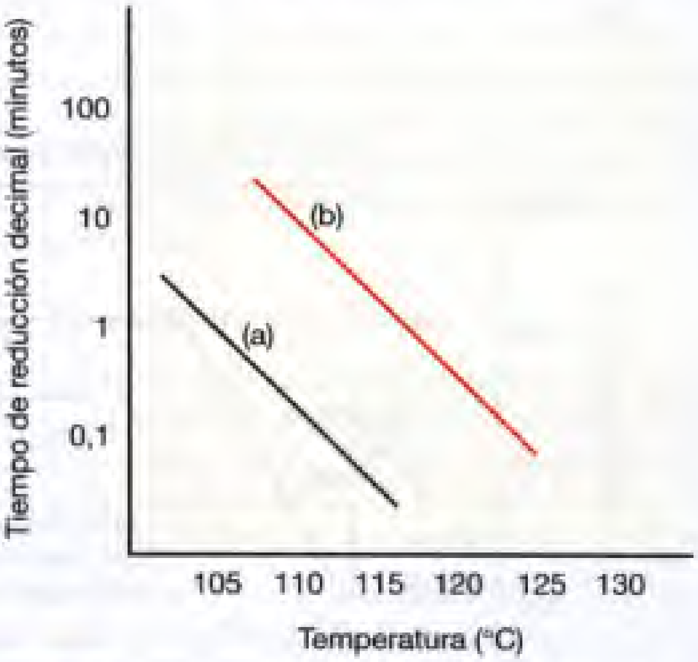


Figura 20.2 Relación entre la temperatura y la tasa de muerte indicada como tiempo de reducción decimal para dos microorganismos diferentes. Los datos se obtuvieron para los tiempos de reducción decimal, *D*, a diferentes temperaturas, como en la Figura 20.1. Para el organismo (a), un mesófilo típico, la exposición a 110°C durante menos de 20 segundos dio como resultado una tiempo de reducción decimal; mientras que para el organismo (b), un termófilo, fueron necesarios 10 minutos para conseguir una reducción decimal.

todas las células a una temperatura determinada. Esto se hace simplemente calentando las muestras de una suspensión celular durante diferentes periodos de tiempo, mezclando las suspensiones calentadas con medio de cultivo e incubando. Si todas las células están muertas, no se observa ningún crecimiento en las muestras incubadas. El tiempo de muerte térmica depende del tamaño de la población ensayada dado que se requiere mayor tiempo para matar todas las células de una población grande que de una pequeña. Una vez que el número de células se ha estandarizado, es posible comparar las sensibilidades al calor de diferentes organismos comparando sus tiempos de muerte térmica, como se muestra gráficamente en la Figura 20.1.

Esporas y esterilización por calor

La resistencia al calor de las células vegetativas y las endosporas bacterianas del mismo organismo varía considerablemente. Por ejemplo, en el autoclave (*véase* abajo) habitualmente se alcanza una temperatura de 121°C. En estas condiciones, las endosporas pueden necesitar de unos 4 a 5 minutos para una reducción decimal, mientras que las células vegetativas pueden requerir sólo de unos 0,1 a 0,5 minutos a 65°C. Por tanto, los procesos para la esterilización eficaz por calor se diseñan para destruir las endosporas.

Las endosporas bacterianas (*véase* Sección 4.15) son las estructuras más resistentes al calor que se conocen: son capaces de sobrevivir a temperaturas que rápidamente matan

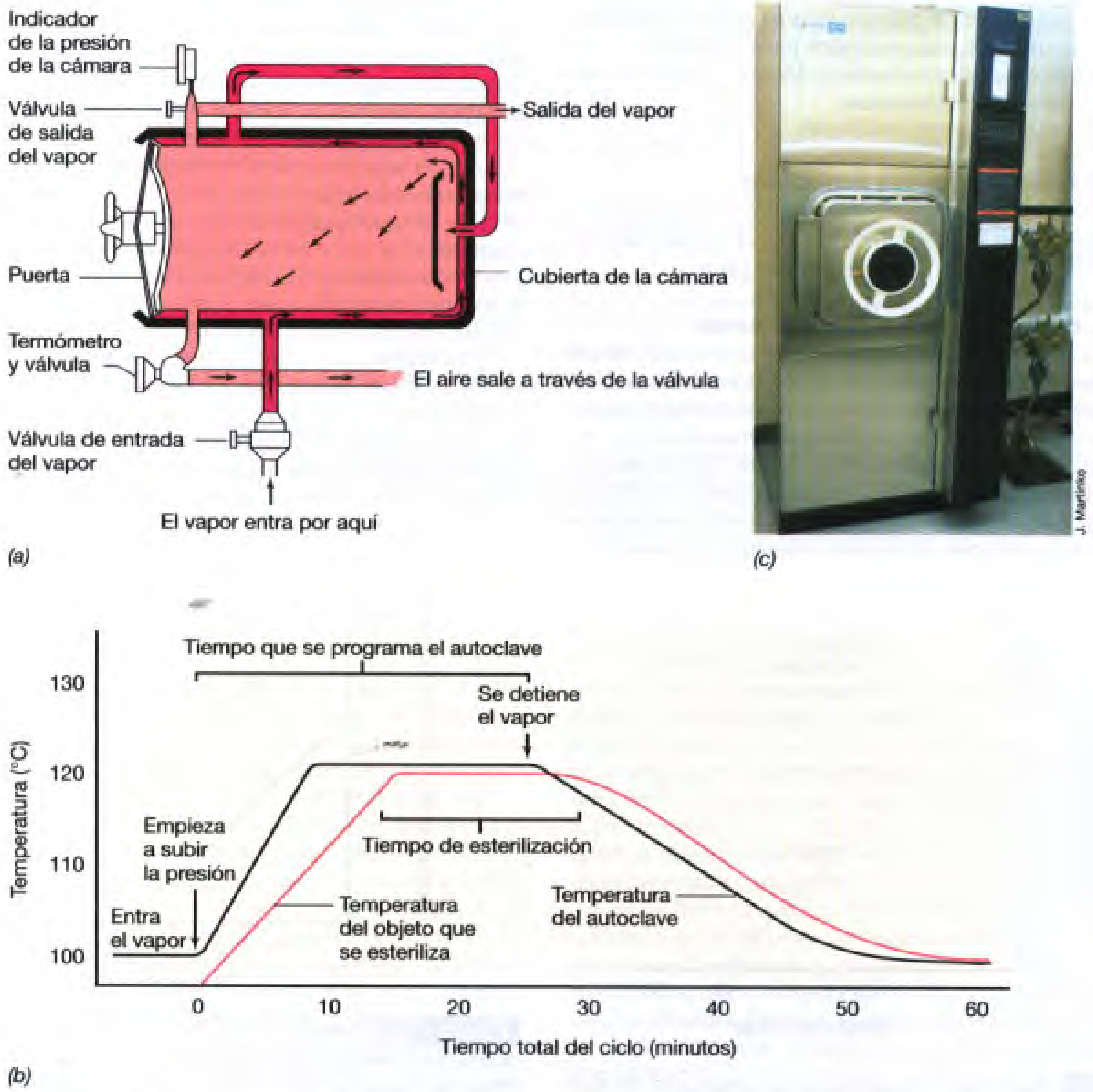

Indicador de la presión de la cámara
Válvula de salida del vapor
Salida del vapor
Puerta
Cubierta de la cámara
Termómetro y válvula
El aire sale a través de la válvula
Válvula de entrada del vapor
El vapor entra por aquí
(a)
(c)
J. Martinko
Tiempo que se programa el autoclave
Se detiene el vapor
Empieza a subir la presión
Entra el vapor
Tiempo de esterilización
Temperatura del objeto que se esteriliza
Temperatura del autoclave
Temperatura (°C)
130
120
110
100
0
10
20
30
40
50
60
Tiempo total del ciclo (minutos)
(b)

Figura 20.3 Utilización del autoclave para la esterilización. (a) Flujo del vapor a través de un autoclave. (b) Ciclo típico de un autoclave. Se muestra la esterilización de un objeto bastante voluminoso. La temperatura del objeto se eleva más lentamente que la temperatura del autoclave. (c) Un autoclave moderno utilizado en los laboratorios de investigación. Obsérvese la puerta y los controles automáticos de los ciclos de esterilización en el panel de la derecha. Las válvulas de entrada y salida del vapor se ven en el lado derecho del autoclave.

a las células vegetativas de la misma especie. Un factor importante en la resistencia al calor es la cantidad (de agua) y estado de *hidratación* en el interior de la endospora. Durante la formación de la endospora, el protoplasma se reduce hasta un volumen mínimo como resultado de la acumulación de Ca^{2+}, de *proteínas de esporulación pequeñas solubles en ácido (SASPs, small acid-soluble spore proteins)* y la síntesis de ácido dipicolínico, lo que contribuye a la formación de una estructura de tipo gel. La contracción del cortex da lugar a un protoplasto deshidratado y reducido con un contenido hídrico de sólo el 10-30% del de una célula vegetativa. El contenido en agua del protoplasto junto con la concentración de SASPs determina la resistencia al calor de la espora. Si las endosporas tienen una baja concentración de SASPs y un elevado contenido en agua, tienen una baja resistencia al calor; en cambio, si tienen una elevada concentración de SASPs y bajo contenido hídrico, tienen una elevada resistencia al calor. El agua se mueve libremente del interior al exterior (y viceversa) de la espora, por lo que no es la impermeabilidad de la pared de la espora la que limita el agua, sino el material tipo gel en el protoplasto de la espora.

La naturaleza del medio en el que el calentamiento tiene lugar también influye en la acción letal tanto de las células vegetativas como de las esporas. La muerte microbiana es más rápida a pH ácido y los alimentos ácidos tales como tomates, frutas y pepinillos se esterilizan mucho más fácilmente que los alimentos neutros como el maíz, alubias y frijoles. Concentraciones altas de azúcares, proteínas y grasas disminuyen la penetración del calor y generalmente aumentan la resistencia de los organismos al calor; mientras que concentraciones altas de sal pueden aumentar o disminuir la resistencia al calor dependiendo del organismo. Las células deshidratadas y secas (y las esporas) son más resistentes que las hidratadas y húmedas; en consecuencia la esterilización por calor de los objetos secos requiere temperaturas superiores y tiempos más largos que la esterilización de los objetos húmedos.

El autoclave

El **autoclave** es un dispositivo sellado que permite la entrada de vapor de agua bajo presión (Figura 20.3). La muerte de las esporas resistentes al calor precisa de un calentamiento a temperaturas por encima del punto de ebullición y la aplicación del vapor de agua bajo presión (Figura 20.3*a*). El procedimiento habitual cosiste en calentar a 1,1 kilogramos/centímetro cuadrado (kg/cm^2) [15 libras/pulgada cuadrada (lb/in^2)] de presión de vapor, lo que permite alcanzar una temperatura de 121°C. A 121°C, el tiempo de esterilización suele ser de 10 a 15 minutos (Figura 20.3*b*). Si se esterilizan objetos voluminosos, la transferencia de calor al interior será lento y el tiempo de calentamiento debe ser suficientemente largo para que *todo* el objeto esté a 121°C durante 10 a 15 minutos. También se requieren mayores tiempos cuando se autoclavan grandes volúmenes de líquidos, dado que los volúmenes grandes tardan más tiempo en alcanzar las temperaturas de esterilización. Observe que no es la *presión* del autoclave la que mata a los microorganismos, sino la *elevada temperatura* que puede alcanzarse cuando el vapor de agua se somete a presión.

Pasteurización

La **pasteurización** es un proceso que reduce la población microbiana en leche y otros alimentos sensibles al calor. Recibe su nombre de Louis Pasteur, quien fue el primero en usar el calor para controlar la contaminación del vino (*véase* el recuadro: «El origen de la pasteurización»). Pasteurización no es sinónimo de esterilización porque en ella no se destruyen todos lo organismos. Inicialmente se utilizó la pasteurización de la leche para matar las bacterias patógenas, especialmente los organismos causantes de la tuberculosis, la brucelosis, la fiebre Q y la fiebre tifoidea, pero con la pasteurización también se mejoró la vida útil de la leche. Aunque estos patógenos ya no son frecuentes en los alimentos en los países desarrollados, la pasteurización impide la transmisión de patógenos como algunas especies de *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 a través de fuentes comunes como la leche y los zumos (jugos). La pasteurización también impide el crecimiento de organismos alterantes e incrementa considerablemente la vida media de los líquidos perecederos (*véanse* Secciones 29.1 y 29.2).

La pasteurización de la leche se realiza habitualmente pasando la leche a través de un intercambiador de calor. La leche se pasa a través de un tubo que está en contacto con una fuente de calor. El control cuidadoso de la tasa de circulación de la leche, y el tamaño y la temperatura de la fuente de calor elevan la temperatura de la leche a 71°C durante 15 segundos. Entonces la leche se enfría rápidamente. Todo el proceso se denomina *pasteurización alta*. La leche también puede calentarse en grandes depósitos a 63-66°C durante 30 minutos. No obstante, este método de *pasteurización baja* es menos satisfactorio porque la leche se calienta y se enfría lentamente y debe mantenerse a temperaturas altas por períodos de tiempo más largos. La pasteurización rápida altera las características organoépticas en menor medida, mata los organismos resistentes al calor con mayor eficacia y habitualmente se realiza en un sistema continuo. El método de pasteurización rápida se adapta mejor a las grandes operaciones de los productos lácticos y las industrias lácticas modernas lo emplean rutinariamente, incluso a tiempos de exposición menores y temperaturas superiores.

✓ 20.1 Revisión de conceptos

La esterilización consiste en la muerte de todos los organismos. La aplicación del calor es el método de esterilización más utilizado. La temperatura para la esterilización por calor se selecciona con el fin de de eliminar la mayoría de los organismos resistentes al calor en el material, habitualmente endosporas bacterianas. Para la esterilización rutinaria se emplea un autoclave; esto permite la aplicación de vapor caliente y alta presión a temperaturas superiores a las del punto de ebullición del agua. La pasteurización mata la mayoría de los microorganismos patógenos, reduce la carga microbiana y el crecimiento de los microorganismos alterantes, incrementando drásticamente la vida útil del producto.

- ✓ ¿Por qué el calor es el agente esterilizante más eficaz?
- ✓ ¿Qué pasos son necesarios para esterilizar un material que puede estar contaminado con endosporas bacterianas?

Aprendiendo del pasado ... El origen de la pasteurización

El nombre de Pasteur está ligado para siempre, en nuestra memoria, al proceso de pasteurización. El desarrollo del proceso de la pasteurización ha sido elegantemente expuesto por René Dubos en su libro sobre la vida de Pasteur[1]. De este libro, aquí transcribimos el siguiente párrafo:

> «La demostración de que los microbios no se generan espontáneamente alentó el desarrollo de técnicas para su destrucción y eviten o reduzcan al mínimo una posterior contaminación. Inmediatamente estos avances provocaron profundos cambios tecnológicos en la preparación y conservación de productos alimentarios y, posteriormente, también en otros procesos industriales...
>
> Pronto se descubrió que la contaminación de los productos biológicos, por microorganismos, puede minimizarse mediante un inteligente y riguroso control de las operaciones tecnológicas, pero no puede evitarse totalmente. Por tanto, el problema estaba en inhibir el posterior desarrollo de estos organismos, una vez que éstos hubiesen llegado al producto. Con esta finalidad, en primer lugar Pasteur intentó añadir una serie de antisépticos, pero los resultados fueron mediocres y, después de muchas vacilaciones, consideró la posibilidad de utilizar el calor como agente esterilizante.
>
> Los primeros estudios de Pasteur sobre el calor como agente conservante los realizó con el vino. Pasteur había crecido en unos de los mejores distritos vinícolas de Francia y, como buen conocedor de esta bebida, estaba preocupado por el hecho de que el calor pudiese alterar las características organolépticas como el aroma y el sabor. Por ello procedió con mucha precaución y finalmente se convenció de que el calentamiento a 55°C no alteraría de forma apreciable el bouquet del vino... Estas consideraciones condujeron a un proceso de esterilización parcial, que pronto sería conocido mundialmente con el nombre de "pasteurización", y que resultó ser aplicable al vino, cerveza, sidra, vinagre, leche e innumerables bebidas, alimentos y productos orgánicos perecederos.
>
> Una de las características de Pasteur fue su inconformismo, no sólo formuló las bases teóricas de la esterilización por calor, sino que participó activamente en el diseño del equipo industrial adaptado al calentamiento de grandes volúmenes de líquidos y a bajo costo. Sus tratados sobre el vinagre, el vino y la cerveza están ilustrados con dibujos y fotografías de este tipo de equipos y describen detalladamente las operaciones implicadas en el proceso. El término "pasteurización" es ciertamente un símbolo de su vida científica; hace referencia a su trascendencia en el establecimiento de las bases teóricas de la teoría sobre el origen de los microorganismos y el enorme esfuerzo que dedicó a que fuese de utilidad para la humanidad. También nos recuerda su famosa afirmación: "No hay una ciencia pura y una ciencia aplicada; sólo hay ciencia y la aplicación de la ciencia."» ■

---

[1] René Dubos, *Pasteur y la ciencia moderna*. 1988. Science Tech. Madison, WI.

20.2 Esterilización por radiación

Una forma eficaz para esterilizar o reducir la carga microbiana de casi cualquier sustancia se realiza mediante la utilización de radiación electromagnética; el calor es sólo un ejemplo. Las microondas, la radiación ultravioleta (UV), los rayos X, las radiaciones gamma (radiaciones γ) y los electrones son tipos de radiación electromagnética (*véase* Sección 10.3) que pueden controlar potencialmente el crecimiento microbiano. Sin embargo, cada tipo de radiación actúa con un mecanismo específico. Por ejemplo, los efectos antimicrobianos de las microondas se deben, al menos en parte, a efectos térmicos. La radiación UV, considerada entre 220 y 300 nm de longitud de onda, actúa con un mecanismo diferente. Las ondas UV tienen suficiente energía para causar roturas en el DNA, produciendo la muerte del organismo expuesto (*véase* Sección 10.3). Esta luz «próxima al visible» se utiliza para la desinfección de superficies, aire y otros materiales como el agua que no absorben la radiación UV. Por ejemplo, las cabinas de los laboratorios de biología vienen equipadas con una lámpara «microbicida» de luz UV para la descontaminación de su superficie después de su uso (Figura 20.4). La radiación UV no penetra las superficies sólidas, opacas, absorbentes de luz, y su utilidad se limita a la desinfección de las superficies expuestas.

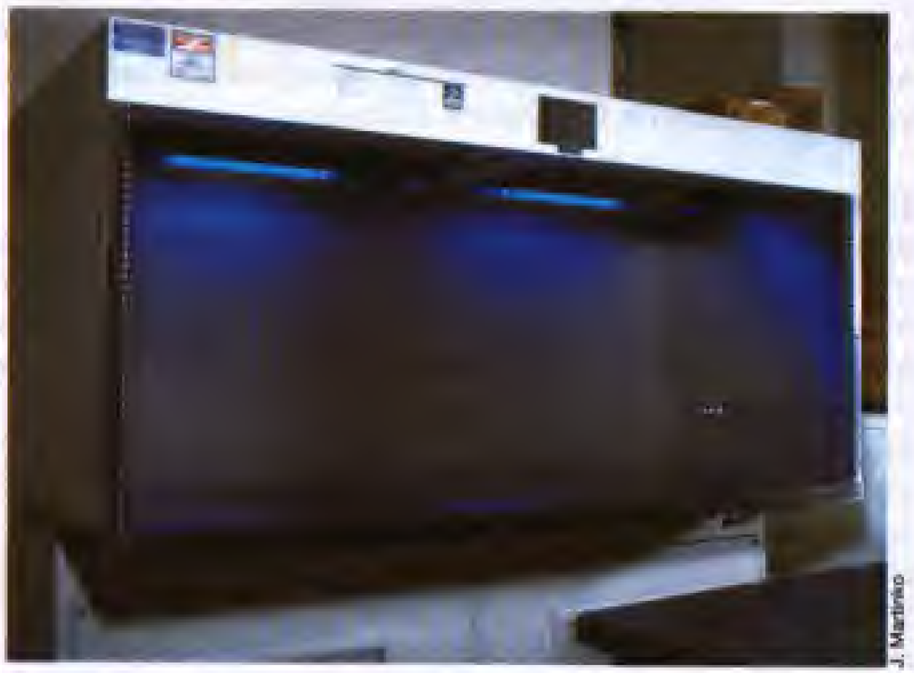

J. Martinko

Figura 20.4 Cámara de seguridad biológica dotada con una fuente de radiación ultravioleta (UV) (lámpara de vapor de mercurio), que se usa para descontaminar las superficies del interior de la misma.

Radiación ionizante

La radiación ionizante es una radiación electromagnética con suficiente energía para producir iones y especies moleculares reactivas con las que colisionan las partículas de la radiación.

La radiación ionizante produce electrones, e^-, radicales hidroxilo, OH ·, y radicales hídrido, H ·. Cada una de estas moléculas reactivas es capaz de degradar y alterar biopolímeros como el acido desoxirribonucleico (DNA) y proteínas. Además, la radiación ionizante puede interaccionar directamente con el DNA rompiendo el biopolímero. La ionización y la posterior degradación de las moléculas biológicas importantes como el DNA y las proteínas enzimáticas producen la muerte de las células irradiadas. Varias fuentes de radiación son potencialmente útiles para la esterilización de la radiación emitida por una fuente. La unidad de radiación es el roetgen, que es una medida de la energía radiante procedente de una fuente. El parámetro estándar para las aplicaciones biológicas tales como la esterilización es la *dosis de radiación absorbida*. La *dosis absorbida* es el rad (100 erg/g), o el gray (1 Gy = 100 rad). Algunos microorganismos son mucho más resistentes a la radiación que otros. La Tabla 20.1 muestra la dosis de radiación necesaria para reducir 10 veces el número de algunos microorganismos representativos o algunas funciones biológicas.

En general, los microorganismos son mucho más resistentes a la radiación ionizante que los organismos pluricelulares. Por ejemplo, la cantidad de energía necesaria para reducir 10 veces la carga bacteriana es al menos de 200 Gy. Por el contrario, se considera que la dosis *letal* de radiación para el hombre es igual o inferior a 10 Gy. Observe que las dosis que muestran en la Tabla 20.1 son las que corresponden a una unidad logarítmica de reducción en el crecimiento de un organismo determinado. La *D10* o *valor de reducción decimal* da una información similar al del tiempo de reducción decimal para la esterilización por calor (*véase* Sección 20.1): la relación de la fracción de supervivientes representada, en una escala semilogarítmica, frente a la dosis de radiación en grays es esencialmente lineal (Figura 20.5). Una dosis *letal* estándar requerida para la esterilización por radiación es 12 *D10*. Para la destrucción de las endosporas radiorresistentes de *Clostridium botulinum*, por ejemplo, se requieren 39 600 Gy (Tabla 20.1).

TABLA 20.1 Sensibilidad a la radiación de los microorganismos y función biológica

Especie o función	Tipo de microorganismo	*D10*[a] (Gy)
Clostridium botulinum	*Bacteria* Gram positivas anaerobias esporuladas	3300
Clostridium tetani	*Bacteria* Gram positivas anaerobias esporuladas	2400
Bacillus subtilis	*Bacteria* Gram positivas anaerobias esporuladas	600
Salmonella typhimurium	*Bacteria* Gram negativa	200
Lactobacillus brevis	*Bacteria* Gram positivas	1200
Deinococcus radiodurans	*Bacteria* Gram negativas resistentes a la radiación	2200
Aspergillus niger	Moho	500
Saccharomyces cerevisiae	Levadura	500
Glosopeda	Virus	13 000
Coxsackie	Virus	4500
Inactivación de enzimas	—	20 000-50 000
Desinfectación de insectos	—	1000-5000

[a] *D10* es la cantidad de radiación necesaria para reducir la población inicial o la actividad inicial a la décima parte (una unidad logarítmica). Gy = grays. 1 gray = 100 rads.

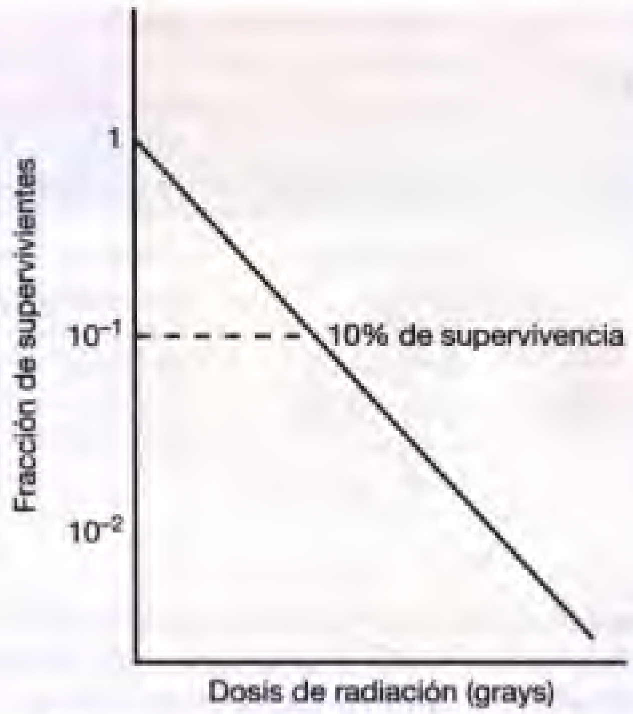


Figura 20.5 Relación entre la fracción de supervivientes y la dosis de radiación. La *D*10, o dosis de reducción decimal, puede interpolarse a partir de los datos mostrados. La dosis en grays es diferente para cada microorganismo.

Práctica de la irradiación

Se dispone de varias fuentes de radiación ionizante, tal como dispositivos productores de rayos X, tubos de rayos catódicos y nucleidos radiactivos. Estas fuentes producen o bien rayos X o bien rayos γ, ambos tipos de rayos tienen suficiente energía y poder de penetración como para inhibir eficazmente el crecimiento microbiano en medio líquido y en medio sólido. Las principales fuentes comerciales de radiación ionizante útil son los nucleidos radiactivos que emiten rayos γ. Los dos isótopos radiactivos más empleados son ^{60}Co y ^{137}Cs, ambos son relativamente baratos producidos por fisión nuclear.

Actualmente la radiación se utiliza para la esterilización y descontaminación de suministros médicos y en la industria de alimentos. En Estados Unidos, la Administración para Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA), ha aprobado el uso de la radiación para la esterilización de dichos objetos, como suministros quirúrgicos, materiales de laboratorio de un solo uso, medicamentos, e incluso injertos de tejidos (Tabla 20.2). Sin embargo, dado el costo y peligrosidad del equipo de radiación, este tipo de esterilización se limita a las aplicaciones industriales a gran escala y a instalaciones muy especializadas. Los alimentos y los productos alimenticios se irradian rutinariamente (*véase* Sección 29.2). Además de la esterilización, la pasteurización y la desinsectación pueden realizarse ajustando la dosis de radiación aplicada. La radiación ha sido aprobada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como medida

TABLA 20.2 Productos usados en medicina y en el laboratorio esterilizados por radiación

Implantes	Medicamentos	Suministros médicos y de laboratorio
Cartílago	Cloranfenicol	Material de laboratorio de un sólo uso
Tendón	Ampicilina	Medios de cultivo
Piel	Tetraciclina	Jeringas
Válvula cardíaca	Atropina	Equipos quirúrgicos
	Vacunas	Suturas
	Ungüentos	

de descontaminación para alimentos particularmente susceptibles de contaminación microbiana, especialmente especias y los productos cárnicos frescos como hamburguesas y pollo, y está aprobada en Estados Unidos para la descontaminación de la carne molida (*véase* Sección 29.2). La utilización de la radiación para todos estos fines es una tecnología establecida y aprobada en muchos paises, pero ha sido aceptada con mayor dificultad en otros debido al temor que suscitan la posible contaminación radiactiva, la alteración del valor nutritivo, los productos tóxicos o carcinogénicos, y la aparición de sabores «desagradables» en los alimentos irradiados.

✓ 20.2 Revisión de conceptos

En condiciones apropiadas, la radiación electromagnética controla eficazmente el crecimiento microbiano. La radiación ultravioleta es útil para descontaminar superficies y materiales que no absorben la luz, como el aire y el agua. La radiación ionizante ha de penetrar en los materiales absorbentes sólidos o ligeros; es muy eficaz para esterilizar y descontaminar.

- ✓ Defina la dosis de reducción decimal para la radiación.
- ✓ ¿Por qué la radiación ionizante es más eficaz que la radiación ultravioleta para esterilizar productos alimentarios?

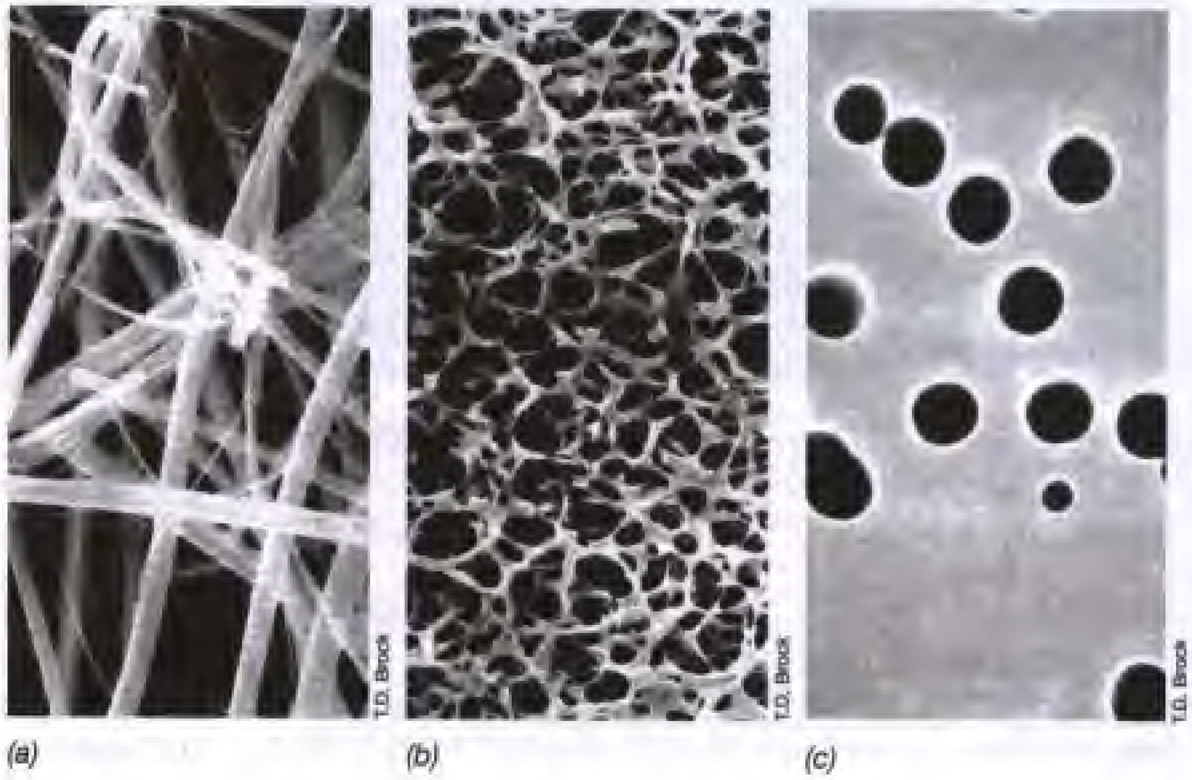
20.3 Esterilización por filtración

Como se acaba de explicar en la Sección 20.1, el calor es el método más común y eficaz para esterilizar líquidos. No obstante, la *filtración* puede usarse para esterilizar líquidos termosensibles o gases. Un filtro es un dispositivo con poros demasiado pequeños para que pasen los microorganismos, pero suficientemente grandes para permitir el paso de un líquido o un gas. El rango del tamaño de las partículas implicadas en la esterilización es muy amplio. Algunas de las células bacterianas de mayor tamaño miden más de 10 μm de diámetro, mientras que las más pequeñas en la escala de tamaños tienen un diámetro menor de 0,3 μm. Históricamente, los métodos de filtración selectiva se utilizaron con el fin de aislar e identificar las partículas infecciosas más pequeñas que las bacterias. Dichas partículas infecciosas, conocidas ahora como virus, son muy pequeñas y tienen un rango de diámetro de 28 μm a 200 μm (*véase* Sección 9.2).

Tipos de filtros

Los tres tipos de filtros principales se muestran en la Figura 20.6. Uno de los tipos más antiguos es el *filtro de profundidad*. Un filtro de profundidad es una lámina fibrosa o tapete hecho de matrices dispuestas al azar de fibras de papel, asbesto o vidrio que se solapan (Figura 20.6*a*). El filtro de profundidad atrapa las partículas en la imbricada trama y urdimbre que se crea a través del espesor (profundidad) de la estructura. Dado que son bastante porosos, los filtros de profundidad se emplean a menudo como *prefiltros* para eliminar, de una solución, las partículas de gran tamaño que pudieran dificultar el proceso final de esterilización por filtración. También se utilizan para esterilizar por filtración el aire en los procesos industriales (*véase* Sección 30.4).

El tipo de filtro más común para la esterilización en microbiología es el *filtro de membrana* (Figura 20.6*b*). Los filtros de membrana se componen de polímeros con una elevada resistencia, como el acetato de celulosa, nitrato de celulosa o polisulfonas, diseñados para presentar numerosos poros



(*a*) (*b*) (*c*)

Figura 20.6 Estructura de (*a*) un filtro en profundidad, (*b*) un filtro de membrana convencional y (*c*) un filtro Nuclepore. Los filtros en profundidad se usan como prefiltros y para la filtración de líquidos con gran cantidad de partículas en suspensión. Los filtros de membrana se usan en muchas aplicaciones en el laboratorio y en la industria, ya que se dispone de una gran variedad de ellos con un amplio rango de tamaños de poros, son económicos y aplicables en casi cualquier situación que requiera una esterilización por filtración. Los filtros Nuclepore, grabado TRACK por nucleación, son útiles en la preparación de muestras para microscopía porque el material filtrado queda retenido y dispuesto en un solo plano en la superficie del filtro.

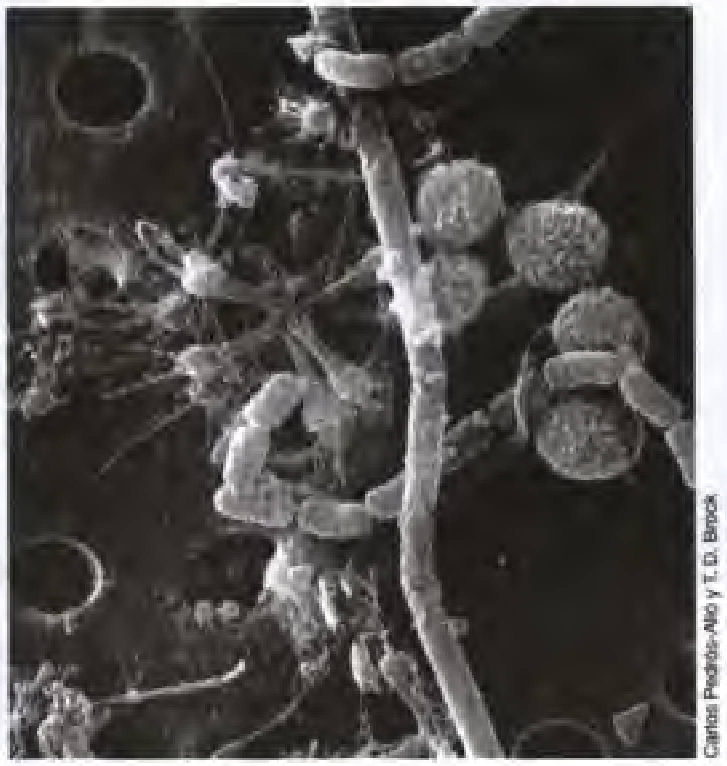
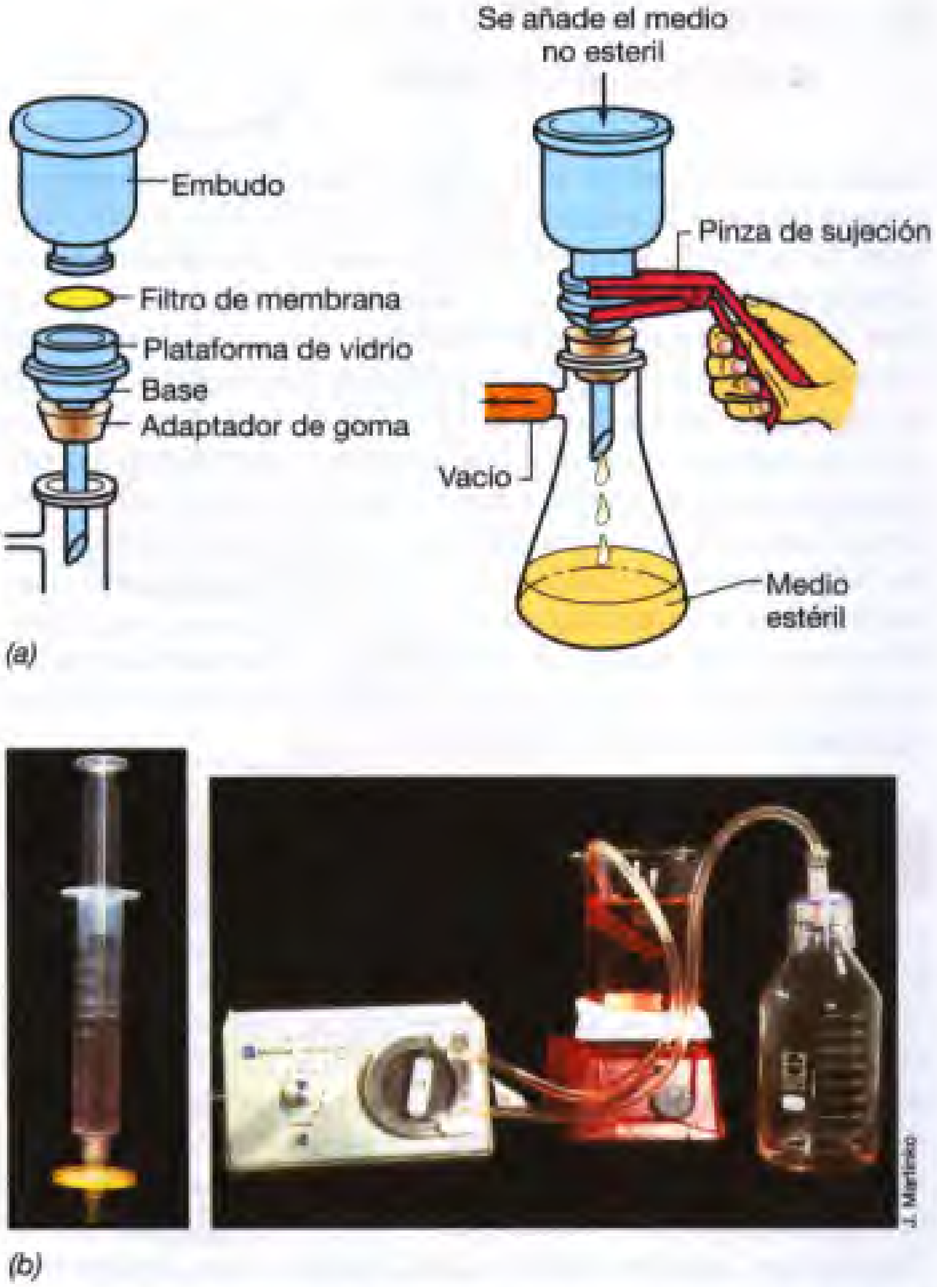

Carlos Pedrós-Alió y T. D. Brock

Figura 20.7 Micrografía al microscopio electrónico de barrido de bacterias acuáticas y algas sobre un filtro Nuclepore. El tamaño del poro es de 5 μm.



J. Martinko

Figura 20.8 Filtros de membrana. (a) Ensamblaje de un sistema reutilizable con filtro de membrana. (b) Unidades dispensables, preesterilizadas y ensambladas de un filtro de membrana. Izquierda: un sistema de filtro diseñado para pequeños volúmenes. Derecha: un sistema de filtro diseñado para mayores volúmenes.

diminutos. Ajustando las condiciones de polimerización durante su fabricación, se puede controlar con precisión el tamaño de los poros de las membranas (y, por tanto, el tamaño de moléculas que pueden pasar a través de ellos). Los filtros de membrana se diferencian de los filtros de profundidad en que funcionan como un tamiz, reteniendo muchas de las partículas en la superficie del filtro. Alrededor del 80-85% de la superficie de las membranas está constituida por poros abiertos, lo que permite obtener una tasa de flujo de líquido relativamente alta.

El tercer tipo de filtro para uso común es el **filtro de nucleación** (Nuclepore). Estos filtros se han obtenido tratando películas muy finas de policarbonato (10 μm de grosor) con radiación nuclear y fracturando la película con un producto químico. La radiación produce microlesiones localizadas en la película y la acción química incrementa el tamaño de los daños microscópicos producidos hasta formar agujeritos (poros). Los tamaños de los microporos se controlan con precisión con el tipo solución química empleada y el tiempo de tratamiento. Un filtro Nuclepore típico tiene agujeritos muy uniformes dispuestos casi verticalmente a través de la fina película (Figura 20.6*c*). Los filtros Nuclepore se usan habitualmente en microscopía electrónica de barrido. Un organismo puede separarse del líquido y concentrarse en un único plano en la superficie del filtro; esto puede observarse con el microscopio (Figura 20.7).

Los filtros de membrana para la esterilización de un líquido se ilustran en la Figura 20.8. El sistema de filtración se esteriliza independientemente del filtro y, posteriormente, el sistema se ensambla en condiciones asépticas en el momento de realizar la filtración. El equipo que se muestra en la Figura 20.8*a* es apropiado para un volumen de líquido pequeño. Para filtrar en condiciones estériles grandes volúmenes, el material para el filtro de membrana se dispone en un cartucho y se coloca en un protector metálico. La filtración de volúmenes grandes de disoluciones líquidas termosensibles es una práctica habitual en la industria farmacéutica.

Los dispositivos de filtros de membrana previamente esterilizados se utilizan de forma rutinaria para esterilizar volúmenes pequeños o medios en la mayoría de los laboratorios (Figura 20.8*b*). Para la filtración se dispone de una jeringa, una bomba o una bomba de vacío que faciliten la entrada del líquido hasta el dispositivo colector estéril, a través del sistema de filtración.

✓ 20.3 Revisión de conceptos

La esterilización por filtración consiste en la *eliminación* de los microorganismos vivos de muestras líquidas. Los filtros de membrana se utilizan generalmente para esterilizar muestras líquidas termosensibles en el laboratorio.

- ✓ ¿Por qué los filtros de profundidad no se usan habitualmente para esterilizar?
- ✓ ¿Qué ventaja tiene el filtro de membrana frente al filtro de nucleación en la esterilización?

II CONTROL QUÍMICO ANTIMICROBIANO

Cada día empleamos una serie de compuestos químicos para controlar el crecimiento de los microorganismos, tanto en las actividades domésticas como en las laborales. Los detergentes y jabones que usamos en la higiene diaria y para lavar la ropa tienen la finalidad, al menos en parte, de reducir la carga microbiana o matar los microorganismos de la superficie corporal o de la ropa. En la cocina, recurrimos a varios agentes químicos que inhiben o destruyen los microorganismos en platos, superficies de trabajo y utensilios. En un laboratorio microbiológico o en instalaciones industriales, los agentes químicos se usan de forma rutinaria para controlar el crecimiento microbiano indeseado. Aquí clasificamos y explicamos los mecanismos de acción de varios agentes químicos que se emplean para controlar los microorganismos en nuestro ambiente.

20.4 Control químico del crecimiento

Un **agente antimicrobiano** es un compuesto químico, natural o sintético, que mata o inhibe el crecimiento de los microorganismos. Los agentes que matan microorganismos se denominan *agentes -cida*, con un prefijo que indica el tipo de microorganismo que mata. Así, tenemos agentes **bactericidas, fungicidas** y **virucidas**. Un agente bactericida mata bacterias; aunque puede matar o no otros microorganismos. Los agentes que no matan pero inhiben el crecimiento se denominan *agentes -estáticos;* así, hablaremos de agentes **bacteriostáticos, fungistáticos** y **virustáticos**.

Los agentes antimicrobianos varían con respecto a su *toxicidad selectiva.* Algunos actúan de forma no selectiva y sobre todos los tipos de células, otros presentan una mayor selectividad y toxicidad para los microorganismos que para los tejidos animales. Aquellos agentes antimicrobianos que tienen toxicidad selectiva son especialmente útiles para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, porque pueden matar el agente etiológico sin dañar al hospedador. Éstos se describirán más adelante en este capítulo.

TUTORÍA Actividad antimicrobiana

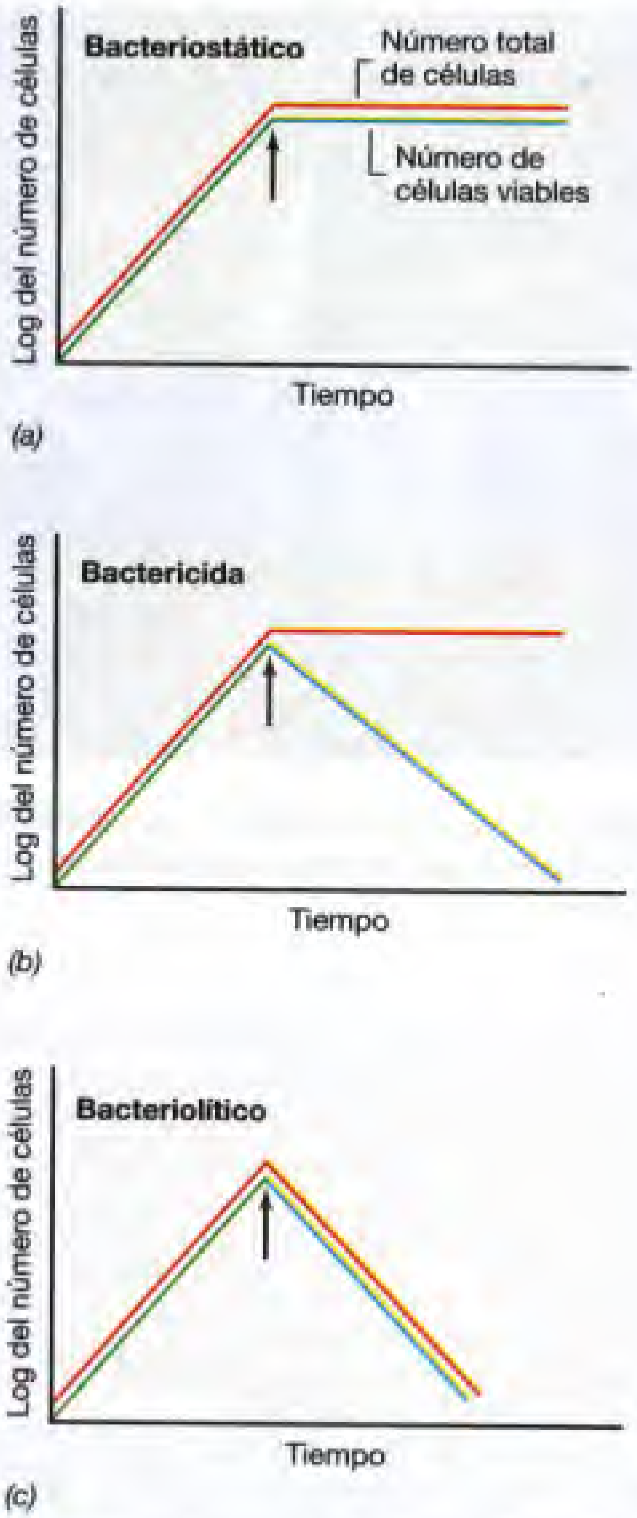


Figura 20.9 Los tres tipos de acción de los antimicrobianos. En el momento (tiempo) indicado por la flecha, se añadió el agente antimicrobiano en una concentración inhibidora del crecimiento, a un cultivo en fase exponencial de crecimiento. Observe la relación entre el número de células viables y células totales.

Efecto de los agentes antimicrobianos sobre el crecimiento

Se observan tres tipos de efectos cuando se añade un agente antimicrobiano a un cultivo bacteriano en fase exponencial de crecimiento: bacteriostático, bactericida y bacteriolítico (Figura 20.9). Se observa un efecto *bacteriostático* cuando se inhibe el crecimiento pero las células no mueren (Figura 20.9*a*). Con frecuencia, los agentes bacteriostáticos son inhibidores de la síntesis de proteínas y actúan uniéndose a los ribosomas. No obstante, dicha unión no es una unión fuerte y, cuando disminuye la concentración del agente, el antimicrobiano se libera de los ribosomas y se reanuda el crecimiento. Muchos antibióticos actúan según este mecanismo; hablaremos de ellos en las Secciones 20.6 a 20.9. Los agentes *bactericidas* matan las células pero no dan lugar a la lisis o rotura de las células (Figura 20.9*b*). Los agentes bactericidas son una clase de agentes químicos que generalmente se unen fuertemente a sus dianas celulares de acción y no se eliminan por dilución. Los agentes *bacteriolíticos* provocan la muerte celular por **lisis**, la rotura celular se detecta por un descenso en el número de células o en la turbidez, después de que se haya añadido el agente (Figura 20.9*c*). Dentro de los agentes bacteriolíticos se incluyen los antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular, como la penicilina (*véanse* Sección 4.8 y Sección 20.8), y los compuestos químicos que lesionan la membrana citoplasmática.

Cuantificación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se mide determinando la cantidad más pequeña que se necesita de un agente para inhibir

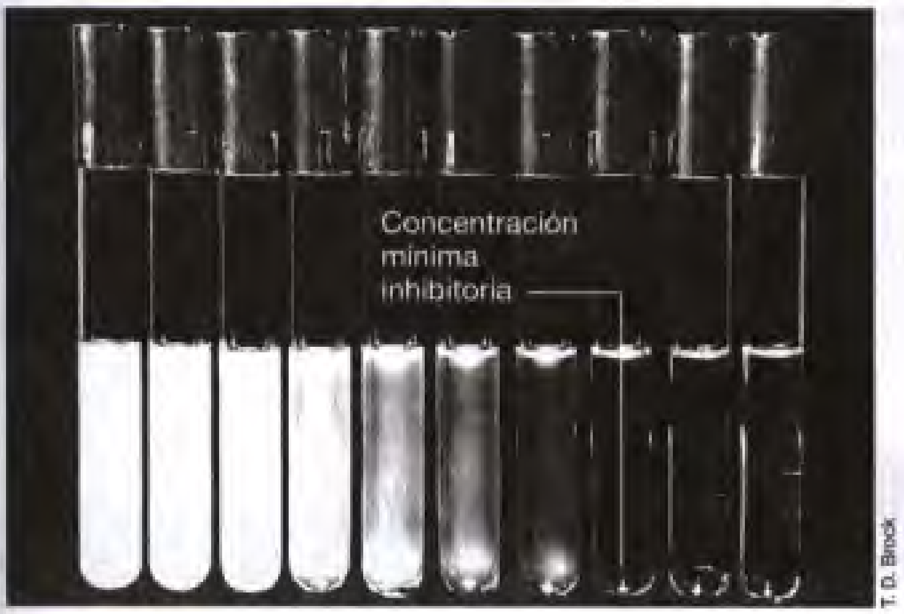

Concentración
mínima
inhibitoria
T. D. Brock

Figura 20.10 Evaluación de un antibiótico mediante el método de «dilución en tubo», que permite determinar la *concentración mínima inhibitoria* (CMI). Se prepara una serie de tubos con concetraciones crecientes del antibiótico en el medio de cultivo; se inoculan todos los tubos y se incuban. El crecimiento (turbidez) tiene lugar en los tubos con concentraciones del antibiótico inferiores a la CMI.

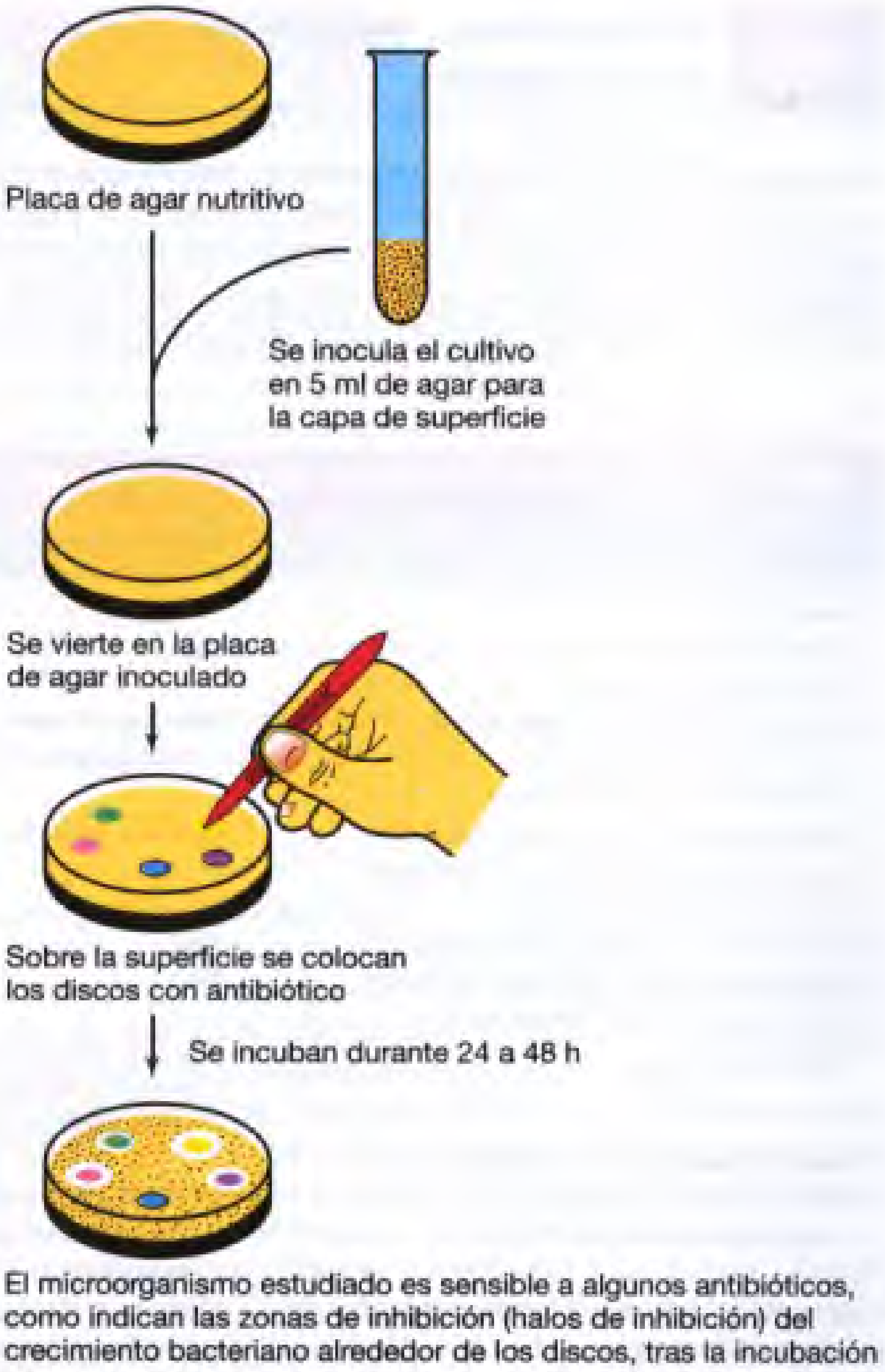

Placa de agar nutritivo
Se inocula el cultivo
en 5 ml de agar para
la capa de superficie
Se vierte en la placa
de agar inoculado
Sobre la superficie se colocan
los discos con antibiótico
Se incuban durante 24 a 48 h
El microorganismo estudiado es sensible a algunos antibióticos,
como indican las zonas de inhibición (halos de inhibición) del
crecimiento bacteriano alrededor de los discos, tras la incubación

Figura 20.11 Método de difusión en agar para determinar la actividad de un antibiótico.

el crecimiento de un organismo control, valor llamado **concentración mínima inhibitoria (CMI)**. Para determinar la CMI, se prepara una serie de tubos de cultivo, cada uno conteniendo un medio con una concentración diferente del agente, y después se inocula la serie de tubos. Después de la incubación, se observa si ha habido crecimiento (turbidez) en los tubos. El tubo que contiene la *menor concentración de agente que inhibe completamente el crecimiento del organismo usado como referencia define la CMI* (Figura 20.10). Este procedimiento simple y eficaz se denomina *técnica de dilución en tubo*. La CMI no es constante para un determinado agente, porque depende del tipo de microorganismo utilizado, el tamaño del inóculo y las condiciones de incubación, como la temperatura, el pH y la aireación. Cuando se estandarizan rigurosamente todas las condiciones, es posible comparar diferentes antimicrobianos y determinar cuál es el agente más eficaz frente a un organismo o calcular la actividad de un único agente frente a diversos organismos. Este método no distingue entre un agente microbicida y un agente microbiostático, dado que el agente está presente en el medio de cultivo durante todo el periodo de incubación.

Otro procedimiento comúnmente utilizado en el estudio de la acción antimicrobiana es el *método de difusión en agar* (Figura 20.11). Se prepara una placa Petri con un medio con agar inoculado uniformemente (en césped) con el microorganismo a ensayar. Cantidades conocidas del agente antimicrobiano se añaden a discos de papel de filtro que se colocan en la superficie del agar. Durante la incubación, el agente difunde desde el papel de filtro al agar; la concentración del agente disminuye a medida que aumenta la distancia al papel de filtro. A una determinada distancia del disco se alcanza la CMI. A partir de ese punto hay crecimiento, pero en las proximidades del disco no hay crecimiento. Se crea entonces una *zona de inhibición*; el diámetro de la zona es proporcional a la cantidad de antimicrobiano añadido al disco, la solubilidad del agente, el coeficiente de difusión y la eficacia del agente. Este método se usa de forma rutinaria para ensayar la sensibilidad a los antibióticos en patógenos (*véase* Sección 24.3).

✓ 20.4 Revisión de conceptos

A menudo se emplean compuestos químicos para controlar el crecimiento microbiano. Los agentes químicos que matan organismos se denominan *agentes -cidas* (microbicidas); mientras que aquéllos que inhiben el crecimiento se denominan -estáticos (microbiostáticos). La eficacia de un agente químico antimicrobiano se cuantifica determinando la concentración mínima necesaria para inhibir completamente el crecimiento bacteriano.

- ✓ Con respecto a los agentes antibacterianos, ¿qué se entiende por *toxicidad selectiva?*
- ✓ Describa cómo se determina la *concentración mínima inhibitoria* de un agente antibacteriano.

20.5 Antisépticos, desinfectantes y esterilizantes

Los **antisépticos** son aquellos agentes químicos que matan o inhiben el crecimiento de los microorganismos y pueden aplicarse en tejidos vivos dada su escasa toxicidad para los tejidos. La mayoría de los compuestos que se encuentran en esta categoría se utilizan en el lavado de manos para tratar heridas superficiales (Tabla 20.3). En algunos casos, algunos antisépticos también son desinfectantes eficaces.

Los **desinfectantes** son productos químicos que matan microorganismos y se usan en objetos inanimados. Los agentes *esterilizantes* son desinfectantes que, en condiciones apropiadas, matan todos los tipos de vida microbiana, y se usan para esterilizar objetos inanimados y superficies. Los desinfectantes químicos, frecuentemente denominados *microbicidas*, tienen una gran aplicación en aquellos casos en

TABLA 20.3 Antisepticos, desinfectantes y esterilizantes

Agente	Aplicación	Modo de acción
Antisépticos		
Alcohol (60-85% etanol o isopropanol en agua)[a]	Piel	Disuelve lípidos y desnaturaliza proteínas
Compuestos que contienen fenol (hexaclorofeno, triclosan, cloroxilenol, clorhexidina)	Jabones, lociones, cosméticos, desodorantes corporales	Altera (rompe) la membrana celular
Detergentes catiónicos, especialmente compuestos de amonio cuaternario (cloruro de benzalconio)	Jabones, lociones	Interacciona con los fosfolípidos de la membrana
Peróxido de hidrógeno (solución al 3%)	Piel	Agente oxidante
Compuestos yodorosos que contienen yodo en solución[a] (Betadine®)	Piel	El yodo se combina con los residuos de tirosina de las proteínas, agente oxidante
Nitrato de plata	Ojos de niños recién nacidos para prevenir la oftalmia y ceguera producida por *Neisseria gonorrhoeae*	Precipita proteínas
Desinfectantes y esterilizantes		
Alcohol (60-85% etanol o isopropanol en agua)[a]	Desinfectante y esterilizante de instrumental médico y superficies de laboratorio	Disuelve lípidos y desnaturaliza proteínas
Detergentes catiónicos (compuestos de amonio cuaternario)	Desinfectante de instrumental médico, alimentos y equipos de industrias lácteas	Interacciona con fosfolípidos
Gas cloro	Desinfectante para la purificación de suministros de agua	Agente oxidante
Compuestos clorados (cloraminas, hipoclorito sódico, dióxido de cloro)	Desinfectante para equipos de industrias de suministros alimentarios y lácteos	Agente oxidante
Sulfato de cobre	Algicida para piscinas, suministros para el agua (desinfectante)	Precipita proteínas
Óxido de etileno (gas)	Esterilizante de materiales termosensibles de laboratorio, como material de plástico	Agente alquilante
Formaldehído	Solución al 3-8% como desinfectante de superficies, al 37% (formalina) o vapor como esterilizante	Agente alquilante
Glutaraldehído	Solución al 2% como desinfectante de nivel de desinfección alto o como esterilizante	Agente alquilante
Peróxido de hidrógeno[a]	Vapor usado como esterilizante	Agente oxidante
Compuestos yodóforos que contienen yodo en solución[a] (Wescodyne®)	Desinfectante de instrumental médico, superficies de laboratorio	El yodo se combina con los residuos de tirosina
Dicloruro de mercurio[b]	Desinfectante de superficies de laboratorio	Se combina con los grupos -SH
Ozono	Desinfectante para el agua potable	Fuerte agente oxidante
Ácido peracético	Solución al 0,2% como desinfectante de nivel de desinfección alto o como esterilizante	Fuerte agente oxidante
Compuestos fenólicos[b]	Desinfectante de superficies de laboratorio	Desnaturaliza proteínas

[a] Los alcoholes, el peróxido de hidrógeno y los compuestos yodóforos que contienen yodo pueden actuar como antisépticos, desinfectantes e incluso esterilizantes dependiendo de la concentración, tiempo de exposición y forma de aplicación.

[b] Los compuestos de metales pesados (mercurio) y los compuestos fenólicos generan residuos peligrosos para el entorno.

TABLA 20.4 Aplicaciones industriales de los desinfectantes

Industria	Productos químicos	Aplicación
Papel	Mercuriales orgánicos, fenoles	Evitar el crecimiento de microorganismos durante la fabricación
Cuero	Metales pesados, fenoles	Los agentes antimicrobianos están presentes en el producto final
Plástico	Detergentes catiónicos	Evitar el crecimiento de bacterias en las dispersiones acuosas de los plásticos
Textil	Metales pesados, fenoles	Evitar el biodeterioro producido por los microorganismos en tejidos expuestos al ambiente, como toldos o tiendas de campaña
Madera	Fenoles	Evitar el deterioro de las estructuras de madera
Trabajos en metal	Detergentes catiónicos	Evitar el crecimiento de bacterias en las emulsiones acuosas usadas al cortar metales
Petróleo	Compuestos de mercurio, fenoles y detergentes catiónicos	Evitar el crecimiento de bacterias durante la recuperación, y el almacenamiento del petróleo y derivados del petróleo
Aire acondicionado	Cloro, fenoles	Evitar el crecimiento de bacterias (por ejemplo, *Legionella*) en torres de refrigeración
Energía eléctrica	Cloro	Evitar el crecimiento de bacterias en condensadores y torres de refrigeración
Energía nuclear	Cloro	Evitar el crecimiento de bacterias resistentes a la radiación en reactores nucleares

los que no se puede usar el calor (*véase* Sección 20.1) o la radiación (*véase* Sección 20.2) en la descontaminación o la esterilización. Por ejemplo, en hospitales y laboratorios han de descontaminarse los suelos, mesas, mesas de laboratorio, paredes, etc. En la industria de alimentos, los suelos, las paredes y las superficies de los aparatos a menudo se tratan con microbicidas con el fin de reducir la carga microbiana, haciendo que las superficies sean inocuas para la manipulación. Los hospitales también deben esterilizar lo materiales termosensibles, tales como termómetros, instrumentos con lentes, tubos de polietileno, catéteres e instrumental clínico reutilizable, como los respirómetros. Generalmente se utiliza algún tipo de *esterilización fría*. La esterilización fría se lleva a cabo en dispositivos cerrados parecidos a los autoclaves, pero emplea un agente químico como el óxido de etileno, el formaldehído, el ácido per-acético o el peróxido de hidrógeno. El agua potable se desinfecta con lejía o con derivados del cloro, a fin de eliminar los organismos potencialmente patógenos (Tabla 20.3).

Varios factores afectan a la eficacia de los diversos procedimientos antisépticos y desinfectantes. Por ejemplo, muchos microbicidas son neutralizados por los materiales orgánicos, inhibiendo su capacidad para matar los microorganismos, reduciendo las concentraciones microbicidas. Por otra parte, a menudo los patógenos se encuentran incluidos en partículas o creciendo en grandes cantidades como *tapetes* y *biopelículas (biofilms)*, que cubren las superficies del tejido con varias capas de células microbianas (*véase* Sección 19.3). En consecuencia, se dificulta la accesibilidad y penetración del agente químico en las células viables e incluso se impide totalmente. En muchos casos, las endosporas bacterianas son mucho más resistentes a los agentes microbicidas que las células vegetativas, por su bajo contenido en agua y metabolismo reducido (*véanse* Sección 20.1 y Sección 4.15). Algunas células vegetativas, como el caso de *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico de la tuberculosis, son resistentes a los agentes microbicidas por la compleja naturaleza de su pared celular (*véanse* Secciones 12.24 y 26.5). Como consecuencia, no siempre se produce la eliminación de los patógenos (esterilización) por tratamiento microbicida. En la práctica, la eficacia de los microbicidas sólo puede determinarse en las condiciones reales de uso. En la Tabla 20.3 se muestra un resumen de los microbicidas más utilizados y sus mecanismos de acción.

Los antisépticos y los desinfectantes químicos tienen muchas aplicaciones en la industria, donde se emplean para impedir el deterioro microbiano de muchos materiales orgánicos. En algunas industrias, los agentes antimicrobianos se utilizan de forma rutinaria y extensiva. Con frecuencia esto genera una serie de problemas por los residuos tóxicos que se producen cuando se liberan al ambiente grandes cantidades de agentes antimicrobianos, como mercurio y otros compuestos de metales pesados (industria papelera) o fenoles (conservantes de la madera). En la Tabla 20.4 se resumen algunas de las aplicaciones industriales de los desinfectantes que se utilizan para controlar el crecimiento microbiano.

✓ 20.5 Revisión de conceptos

Los antisépticos se utilizan para descontaminar tejidos vivos. Los desinfectantes son compuestos químicos que se usan para descontaminar o esterilizar materiales inertes; estos compuestos tienen muchas aplicaciones comerciales, sanitarias e industriales.

✓ Diferencie entre un antiséptico y un desinfectante.

✓ ¿Qué desinfectantes se emplean para esterilizar el agua?

III AGENTES ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS *IN VIVO*

Varios agentes antimicrobianos, sintéticos y naturales, se utilizan en el tratamiento de las infecciones microbianas *in vivo*. Estos compuestos revolucionaron el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

Clasificación del antibiótico	Subclasificación	Ejemplo
I. Compuestos que contienen carbohidratos	Azucares puros	Nojirimicina
	Aminoglicósidos	Estreptomicina
	Ortosomicinas	Everninomicina
	N-Glicósidos	Estreptotricina
	C-Glicósidos	Vancomicina
	Glicolípidos	Moenomicina
II. Lactosas macrocíclicas	Antibióticos macrólidos	Eritromicina
	Antibióticos poliénicos	Candicidina
	Ansamicinas	Rifampina
	Macrotetrólidos	Tetranactina
III. Quinonas y compuestos relacionados	Tetraciclinas	Tetraciclina
	Antraciclinas	Adriamicina
	Naftoquinonas	Actinorrodina
	Benzoquinonas	Mitomicina
IV. Aminoácidos y análogos peptídicos	Derivados aminoacídicos	Cicloserina
	Antibióticos β-lactámicos	Penicilina, ceftriaxona
	Antibióticos peptídicos	Bacitracina
	Cromopéptidos	Actinomicina
	Depsipéptidos	Valinomicina
	Péptidos formadores de quelato	Bleomicina
V. Compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno	Antibióticos nucleosídicos	Polioxinas
VI. Compuestos heterocíclicos que contienen oxígeno	Antibióticos poliéter	Monensina
VII. Derivados alicíclicos	Derivados del cicloalcano	Cicloheximida
	Antibióticos esteroideos	Ácido fusídico
VIII. Compuestos aromáticos	Derivados del benceno	Cloranfenicol
	Aromáticos condensados	Griseofulvina
	Éter aromáticos	Novobiocina
IX. Compuestos alifáticos	Compuestos que contienen fósforo	Fosfomicina
X. Compuestos quinolónicos	4-Quinolona	Ácido nalidíxico
	Fluoro-4-quinolonas	Ciprofloxacino
XI. Oxazolidinona	Lactona cíclica	2-Oxazolidinona

Estructura representativa

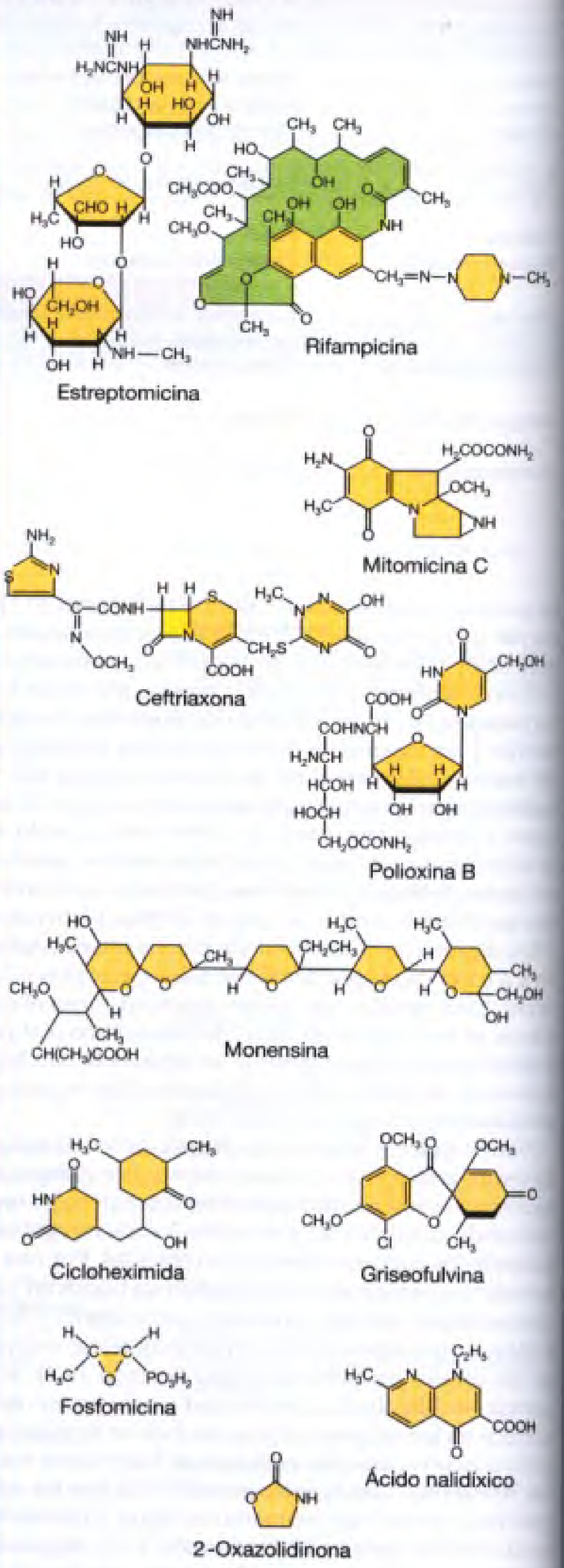


Figura 20.12 Clasificación de los quimioterápicos antibacterianos (antibióticos) según su estructura química. Se muestra un ejemplo representativo de cada grupo.

20.6 Antimicrobianos sintéticos

La sección precedente trató de agentes químicos que inhiben el crecimiento microbiano *fuera* del cuerpo humano. La mayoría de los químicos mencionados son demasiado tóxicos para usarse en el interior del cuerpo, aunque los antisépticos pueden emplearse en la piel. A fin de controlar las enfermedades infecciosas, es necesario disponer de compuestos químicos que puedan usarse por vía interna. Tales compuestos se denominan **agentes quimioterapéuticos** y son muy importantes en medicina clínica y veterinaria, así como en agricultura.

Los agentes quimioterapéuticos se clasifican según su estructura (Figura 20.12) y mecanismo de acción (Figura 20.13). Anualmente se fabrican y utilizan en todo el mundo más de 500 toneladas métricas de agentes quimioterapéuticos (Figura 20.14). El requisito clave de todo buen agente quimioterapéutico es la *toxicidad selectiva*, es decir, la capacidad de inhibir las bacterias u otros agentes patógenos sin afectar al hospedador (*véase* el recuadro «Balas mágicas»). Cada agente tiene un espectro característico de acción antibacteriana (Figura 20.15). Los agentes quimioterapéuticos se agrupan en dos categorías generales, los *agentes sintéticos* y los *antibióticos*. Aquí nos centraremos en los agentes de origen sintético. Hablaremos de los antibióticos en las tres secciones siguientes.

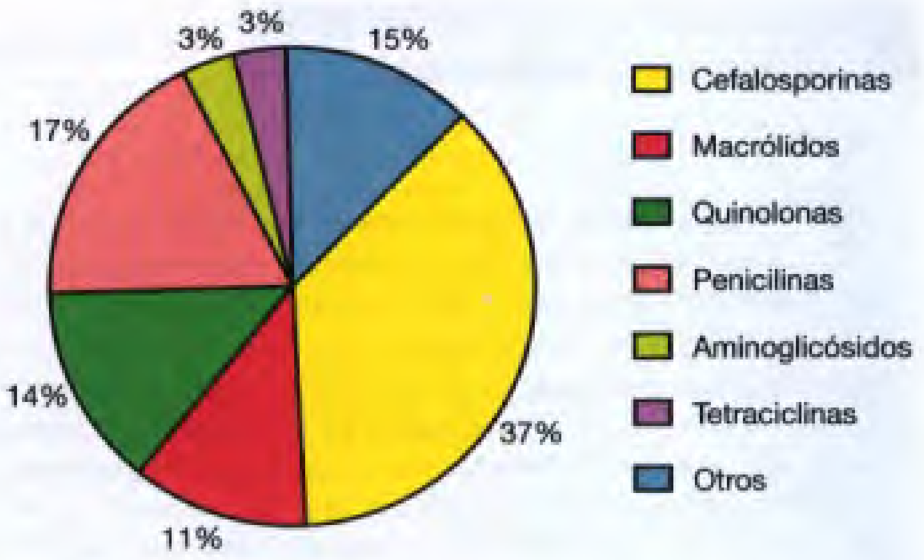


Figura 20.14 Producción mundial anual y consumo de antibióticos. Cada año se manufacturan más de 500 toneladas métricas de agentes quimioterapéuticos.

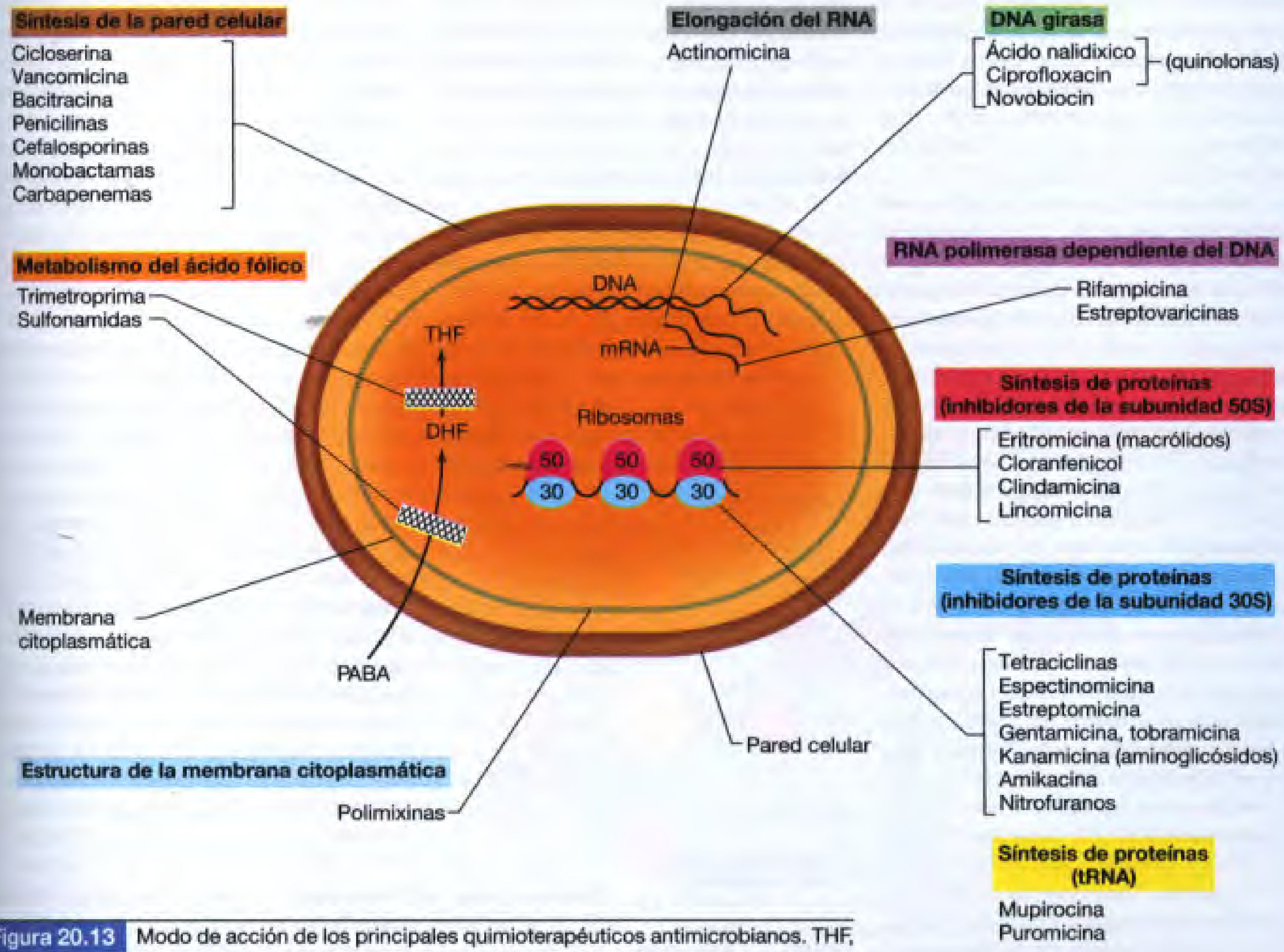

Síntesis de la pared celular
Cicloserina
Vancomicina
Bacitracina
Penicilinas
Cefalosporinas
Monobactamas
Carbapenemas
Elongación del RNA
Actinomicina
DNA girasa
Ácido nalidíxico
Ciprofloxacin
Novobiocin
(quinolonas)
Metabolismo del ácido fólico
Trimetroprima
Sulfonamidas
RNA polimerasa dependiente del DNA
Rifampicina
Estreptovaricinas
DNA
mRNA
THF
DHF
Ribosomas
50
30
Síntesis de proteínas (inhibidores de la subunidad 50S)
Eritromicina (macrólidos)
Cloranfenicol
Clindamicina
Lincomicina
Síntesis de proteínas (inhibidores de la subunidad 30S)
Tetraciclinas
Espectinomicina
Estreptomicina
Gentamicina, tobramicina
Kanamicina (aminoglicósidos)
Amikacina
Nitrofuranos
Membrana citoplasmática
PABA
Pared celular
Estructura de la membrana citoplasmática
Polimixinas
Síntesis de proteínas (tRNA)
Mupirocina
Puromicina

Figura 20.13 Modo de acción de los principales quimioterapéuticos antimicrobianos. THF, Tetrahidrofolato; DHF, dihidrofolato; mRNA, RNA mensajero; tRNA, RNA de transferencia.

Aprendiendo del pasado ...

La microbiología y las «balas mágicas»

El desarrollo de los agentes quimioterapéuticos comenzó con el científico alemán Paul Ehrlich. En los primeros años del 1900, Ehrlich desarrolló el concepto de toxicidad selectiva. Empezó su trabajo estudiando la tinción de microorganismos y observó que algunos colorantes teñían los microorganismos pero no los tejidos animales. Asumió que si un colorante no tiñe un tejido, las moléculas del colorante no son capaces de combinarse con los componentes celulares. Luego hizo el razonamiento de que si ese colorante tuviese propiedades tóxicas, no afectaría a las células animales porque sería incapaz de combinarse con ellas, pero debería atacar a las células microbianas. Por tanto, en un animal infectado las sustanticas químicas se comportarían como «balas mágicas», «dando» en los microorganismos pero evitando las células del hospedador. Ehrlich procedió a ensayar la selectividad de una serie de compuestos químicos y descubrió los primeros agentes quimioterapéuticos, de los que el Salvarsán, un compuesto que contiene arsénico y se empleaba en el tratamiento de la sífilis, fue el más famoso (*véase* Figura 1).

No obstante, no se descubieron agentes químicos activos frente a la gran mayoría de los microorganismos patógenos hasta los años del 1930, cuando Gerard Domag descubrió las sulfamidas. El descubrimiento de las sulfamidas surgió como consecuencia de la búsqueda, a gran escala, de productos químicos que fuesen activos frente a enfermedades infecciosas en animales de experimentación. En la Compañía Química Bayer en Alemania, Domag ensayó una gran cantidad de compuestos orgánicos sintéticos, principalmente colorantes, por su capacidad para curar infecciones estreptocócicas en ratones. El primer compuesto activo fue el Prontosil, que era activo en los ratones pero no tenía actividad sobre los estreptococos cultivados en el tubo de ensayo. Domag descubrió que, en el cuerpo del animal, el Pronotosil se degradaba a sulfanilamida y éste era verdaderamente el agente activo. Un programa de síntesis basado en la estructura de la sulfanilamida dió como resultado la producción de una gran cantidad de medicamentos activos. Posteriormente en Inglaterra, D. D. Woods demostró que el ácido *p*-aminobenzoico contrarrestaba específicamente la acción inhibidora de la sulfanilamida y que los estreptococos requerían el ácido *p*-aminobenzoico para su crecimiento. Esto condujo al concepto de *análogo de factor de crecimiento*, que permitió a los químicos proseguir la síntesis de una gran variedad de agentes químicos quimioterapéuticos.

A pesar del éxito de las sulfamidas en el control de las infecciones estreptocócicas, la mayoría de las enfermedades infecciosas aún no estaban bajo control. El descubrimiento del primer antibiótico —la penicilina— por Alexander Fleming, un médico escocés dedicado a la investigación en el Hospital St. Mary de Londres, proporcionó a los investigadores una nueva fuente de compuestos antimicrobianos. Los antibióticos eran compuestos completamente nuevos que no se habían detectado anteriormente en la naturaleza. Parece ser que, para poder competir con éxito por las fuentes limitadas de nutrientes y energía, muchos microorganismos producen y secretan uno o más compuestos tóxicos para los competidores microbianos en el ambiente (*véase* Sección 12.24). El primer trabajo de Fleming sobre la penicilina, publicado en 1929, empieza de este modo:

> «Mientras trabajaba con variantes de estafilococos abandoné sobre la mesa del laboratorio una serie de placas de cultivo y las fui examinando de vez en cuando. Para poder examinarlas, estas placas se exponían necesariamente al aire y se contaminaron con una serie de «microorganismos». Observé que alrededor de una colonia grande de un hongo contaminante, las colonias de estafilococos se hacían transparentes y sufrían una lisis obvia. Se hicieron resiembras de este hongo y se realizaron experimentos encaminados a comprobar las propiedades de la sustancia bacteriolítica que, era evidente, se había formado en el cultivo del hongo y había difundido al medio circundante.»

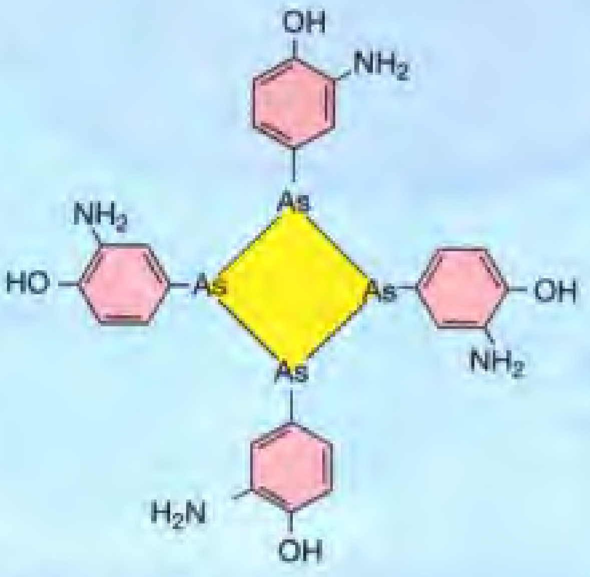


Figura 1 **Salvarsán**

Fleming caracterizó el producto y, como lo producía un hongo del género *Penicillium*, le dió el nombre de *penicilina*. Sin embargo, su trabajo no incluyó un proceso para la producción a gran escala, ni demostró que la penicilina fuese efectiva en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Esto lo hizo, en 1939, un grupo de científicos británicos en la Universidad de Oxford, dirigidos por Howard Florey, motivados en parte por la inminente Segunda Guerra Mundial y el conocimiento de que las enfermedades infecciosas eran la principal causa de muerte de los soldados en el campo de batalla. Florey y sus colaboradores desarrollaron métodos para el análisis y ensayo de la penicilina, y para su producción en grandes cantidades. Luego, procedieron a ensayar la penicilina en infecciones bacterianas en seres humanos. La penicilina fue espectacularmente más eficaz en el control de las infecciones por estafilococos y pneumococos; y también fue más efectiva en las infecciones estreptocócicas que las sulfamidas. Con el agravamiento de la guerra en Europa, en 1941 Florey llevó a Estados Unidos los cultivos del hongo productor de la penicilina. Persuadió al gobierno de Estados Unidos para que crease un programa de investigación a gran escala, aunando los esfuerzos conjuntos de la industria farmacéutica, el Departamento de Agricultura de USA en su laboratorio de Peoria, Illinois, y varias universidades. Al final de la Segunda Guerra Mundial, se disponía de grandes cantidades de penilicina tanto para el uso militar como civil. Una vez finalizada la guerra, las compañías farmacéuticas empezaron la producción de penilicina de forma competitiva y comenzaron a buscar otros antibióticos. El éxito fue rápido y espectacular, y el impacto en la medicina extraordinario. La mortalidad y la morbilidad infantiles se redujeron enormemente, y muchas enfermedades que tenían elevadas tasas de mortalidad son ahora consideradas poco más que curiosidades médicas. ■

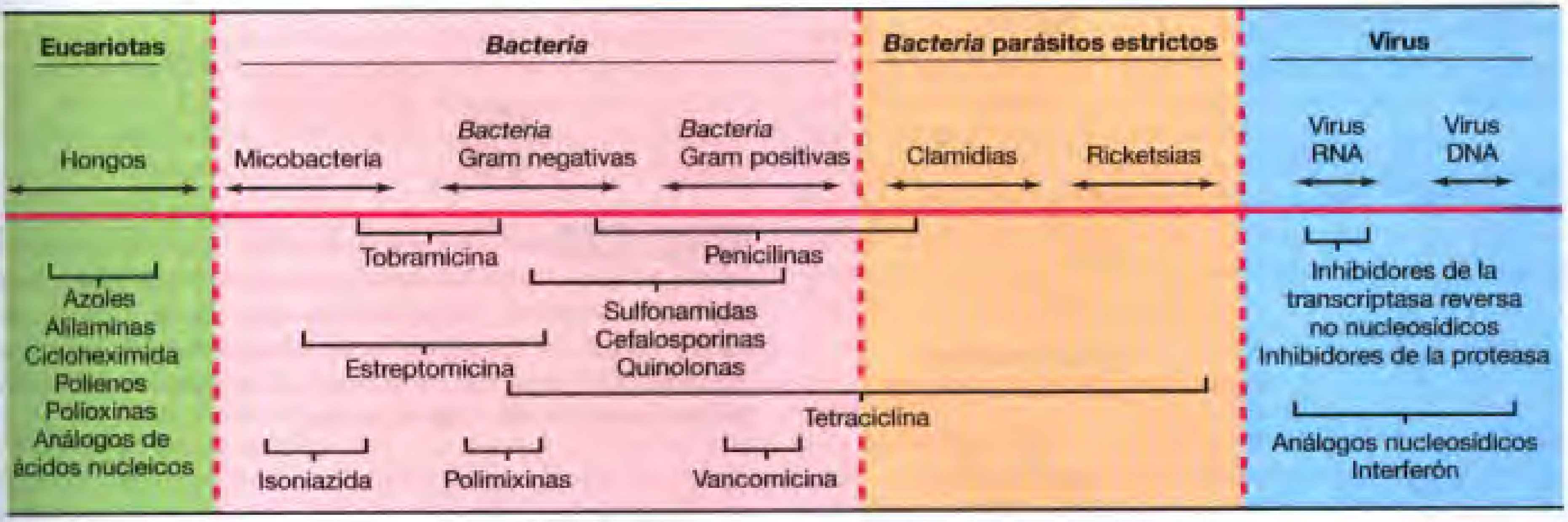

Eucariotas
Bacteria
Bacteria parásitos estrictos
Virus
Hongos
Micobacteria
Bacteria Gram negativas
Bacteria Gram positivas
Clamidias
Ricketsias
Virus RNA
Virus DNA
Azoles
Alilaminas
Cicloheximida
Polienos
Polioxinas
Análogos de ácidos nucleicos
Tobramicina
Penicilinas
Sulfonamidas
Cefalosporinas
Quinolonas
Estreptomicina
Tetraciclina
Isoniazida
Polimixinas
Vancomicina
Inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleosídicos
Inhibidores de la proteasa
Análogos nucleosídicos
Interferón

Figura 20.15 Espectro de acción antimicrobiana de algunos agentes quimioterapéuticos seleccionados.

Análogos de los factores de crecimiento

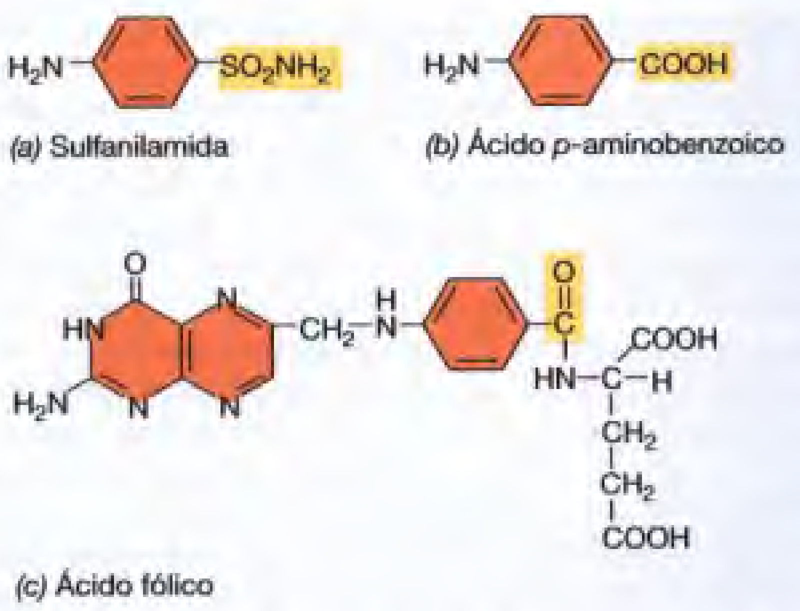
En la Sección 5.1 definimos los factores de crecimiento como sustancias químicas específicas que se *requieren* en el medio de cultivo porque los microorganismos no pueden sintetizarlas. Una sustancia relacionada o parecida a un factor de crecimiento, pero que bloquea la utilización de dicho factor, se denomina **análogo del factor de crecimiento**. Los análogos de los factores de crecimiento son compuestos sintéticos estructuralmente similares a los factores de crecimiento en cuestión, pero que poseen diferencias estructurales sutiles que les impide realizar (duplicar) la función del factor de crecimiento natural en la célula. Además de los análogos de los factores de crecimiento bacterianos, de los que tratamos ahora, existen varios análogos de los factores de crecimiento que son activos en el tratamiento de infecciones víricas y fúngicas, de los que trataremos en las Secciones 20.10 y 20.11.

Sulfamidas

Las *sulfamidas* fueron los análogos de factores de crecimiento que más se utilizaron en un principio para inhibir específicamente el crecimiento de las bacterias (*véase* Figura 20.16). La sulfamida más simple es la *sulfanilamida* (Figura 20.16*a*). La sulfanilamida es un análogo del ácido *p*-aminobenzoico (Figura 20.16*b*) que, a su vez, forma parte del ácido fólico (vitamina) (Figura 20.16*c*). La sulfanilamida actúa bloqueando la síntesis del ácido fólico, un precursor del ácido nucleico. La sulfanilamida es activa en *Bacteria* pero no en animales superiores, debido a que las *Bacteria* sintetizan su propio ácido fólico, mientras que los animales superiores obtienen el ácido fólico de su dieta. La resistencia a la utilización clínica de los derivados de la sulfanilamida, las sulfonamidas, es muy común, debido a que *Bacteria* resistentes han desarrollado la capacidad de utilizar fuentes exógenas de ácido fólico sintetizado (Sección 20.12).

Otros análogos de los factores de crecimiento

Actualmente se conocen análogos de varias vitaminas, aminoácidos, purinas, pirimidinas y otros compuestos. Estos análogos se parecen a diversos compuestos que se encuentran en diversos organismos, como muchos eucariotas y virus. Un importante ejemplo de un análogo de factor de crecimiento muy utilizado en medicina es la *isoniazida* (*véase* Figura 26.5). La isoniazida tiene un espectro de acción muy estrecho (Figura 20.15) y sólo es eficaz frente a *Mycobacterium tuberculosis*, interfiriendo la síntesis de los ácidos micólicos, material específico de la pared celular de las micobacterias. El compuesto sintético, un análogo de la nicotinamida (vitamina) ha sido el fármaco, de utilización única, más eficaz en el control y tratamiento de la tuberculosis (Figura 20.15, *véase* Sección 26.5). En los ejemplos que se muestran en la Figura 20.17, los análogos se han sintetizado por adición de un átomo de flúor o de bromo. El flúor es un átomo relativamente pequeño y no afecta a la estructura general de la molécula, pero cambia suficientemente las propiedades químicas como para que el compuesto no actúe de forma normal en el metabolismo celular. El fluorouracilo se

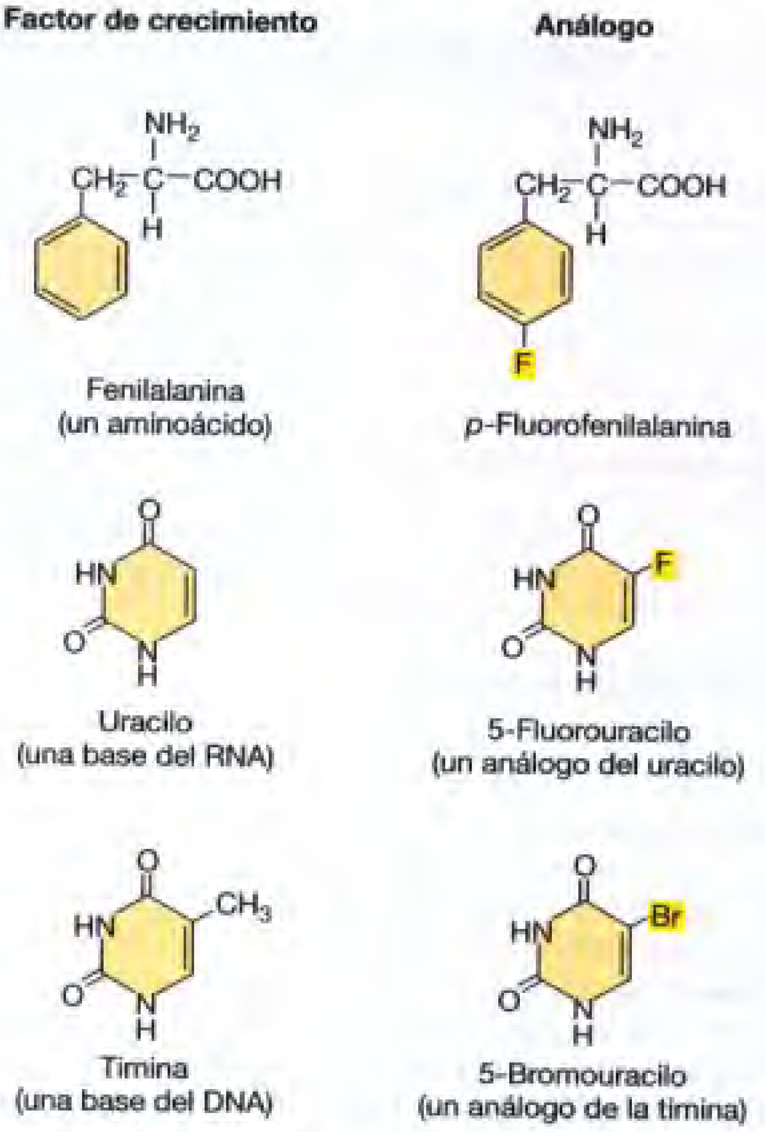

H₂N
SO₂NH₂
H₂N
COOH
O
HN
H₂N
N
N
N
CH₂
H
N
O
C
COOH
HN
C
H
CH₂
CH₂
COOH

(a) Sulfanilamida

(b) Ácido *p*-aminobenzoico

(c) Ácido fólico

Figura 20.16 (a) La sulfa más sencilla, la sulfanilamida. (b) La sulfanilamida es un análogo del ácido *p*-aminobenzoico, que a su vez forma parte del ácido fólico (c), que es un factor de crecimiento (*véase* Sección 5.1 donde se explican los factores de crecimiento).



Fenilalanina
(un aminoácido)

p-Fluorofenilalanina

Uracilo
(una base del RNA)

5-Fluorouracilo
(un análogo del uracilo)

Timina
(una base del DNA)

5-Bromouracilo
(un análogo de la timina)

Figura 20.17 Factores de crecimiento y análogos estructuralmente similares.

parece al uracilo, una base del ácido nucleico; el bromouracilo es similar a otra base, la timina. Los análogos de los factores de crecimiento que se parecen a los ácidos nucleicos se usan en el tratamiento de infecciones víricas y fúngicas, así como de mutágenos (*véanse* Secciones 20.10, 20.11 y 10.3).

Quinolonas

Las quinolonas no son análogos de factores de crecimiento, sino una clase de antibióticos sintéticos que interaccionan con la DNA girasa bacteriana impidiendo que la girasa produzca un DNA bacteriano superenrollado, necesario para el empaquetamiento del DNA en la célula bacteriana (*véase* Sección 7.3). El ácido nalidíxico es la quinolona prototipo (Figuras 20.12 y 20.13). Los derivados fluoroquinolónicos del ácido nalidíxico (quinolona de 1ª generación), como el norfloxacino y el ciprofloxacino (quinolonas de 2ª generación) (Figura 20.18) se utilizan habitualmente en el tratamiento de infecciones del tracto urinario en humanos. El ciprofloxacino también es el tratamiento de elección para las infecciones causadas por las cepas resistentes a penicilina de *Bacillus anthracis*, agente etiológico del carbunco (ántrax maligno) (*véase* Sección 25.11). Dado que la DNA girasa se encuentra en todas las *Bacteria*, las fluoroquinolonas son eficaces en el tratamiento de las infecciones por bacterias Gram positivas y Gram negativas (Figura 20.25). Las fluoroquinolonas también se usan industrialmente en la cría de terneros y pollos para evitar infecciones respiratorias.

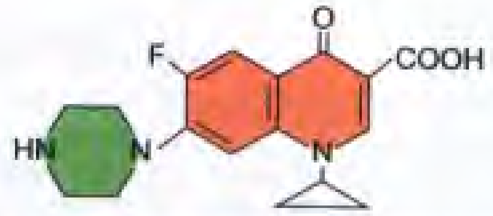


Figura 20.18 Estructura del ciprofloxacino, una quinolona. Los derivados fluorados del ácido nalidíxico (Figura 20.12) son más solubles que el ácido nalidíxico y alcanzan niveles clínicamente terapéuticos en sangre y tejidos. El ciprofloxacino se usa en el tratamiento de las infecciones del tracto urinario y en el carbunco producido por cepas de *Bacillus anthracis* resistentes a penicilia.

✓ 20.6 Revisión de conceptos

Los quimioterápicos sintéticos tienen toxicidad selectiva para *Bacteria* y pueden usarse por vía interna. Los análogos de factores de crecimiento como la sulfanilamida son inhibidores metabólicos sintéticos. Las quinolonas inhiben la actividad de la DNA girasa en *Bacteria*.

- ✓ Señale al menos dos características que diferencien los agentes quimioterapéuticos sintéticos de los antisépticos y desinfectantes.
- ✓ ¿Qué se entiende por *toxicidad selectiva*?

20.7 Antimicrobianos naturales: antibióticos

Los **antibióticos** son compuestos químicos producidos por microorganismos, que inhiben o matan a otros microorganismos. Los antibióticos se diferencian de los análogos de los factores de crecimiento en que son productos naturales (producidos por la actividad microbiana) más que compuestos químicos sintéticos. Constituyen una de las clases más importantes de sustancias producidas por procesos microbianos a gran escala. La producción industrial de antibióticos se comentará en el Capítulo 30.

Dianas de antibióticos

Se ha descubierto un gran número de antibióticos, pero menos del 1% tienen aplicación en medicina. No obstante, los antibióticos han tenido un sustancial impacto en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Por otra parte, para muchos antibióticos se ha mejorado su eficacia modificándolos químicamente en el laboratorio; son los llamados *antibióticos semisintéticos*.

La sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos y otros agentes quimioterapéuticos varía (Figura 20.15). Las *Bacteria* Gram positivas son generalmente más sensibles a los antibióticos que las *Bacteria* Gram negativas, aunque algunos antibióticos sólo actúen en *Bacteria* Gram negativas. Un antibiótico que actúe tanto en *Bacteria* Gram positivas como Gram negativas se denomina **antibiótico de amplio espectro**. En general, un antibiótico de amplio espectro tiene mayor aplicación en medicina que un *antibiótico de espectro reducido*, que sólo es activo para un único grupo de organismos. Sin embargo, un antibiótico con un espectro de acción limitado puede ser de gran valor en el control de microorganismos que no son sensibles a otros antibióticos (o dejan de serlo). Un ejemplo es la vancomicina, un glicopéptido bactericida que actúa frente a *Bacteria* Gram positivas de los géneros *Staphylococcus, Bacillus* y *Clostridium* (Figuras 20.12, 20.13 y 20.15).

Los antibióticos y otros agentes quimioterapéuticos pueden agruparse según su estructura química (Figura 20.12) o su mecanismo de acción (Figura 20.13). En *Bacteria*, las dianas importantes para la acción de los antibióticos son la pared celular (por ejemplo, vancomicina), la membrana citoplasmática (polimixinas), la biosíntesis de las proteínas (los macrólidos y tetraciclinas) y la síntesis de los ácidos nucleicos (rifampicina). Aquí expondremos brevemente los mecanismos para inhibir la síntesis de las proteínas y la transcripción.

Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas

Muchos antibióticos inhiben la síntesis de las proteínas interaccionando con el ribosoma (Figura 20.13). Estas interacciones son muy específicas y muchas implican al rRNA. Algunos de estos antibióticos se usan en la práctica médica y otros son eficaces como herramientas en la investigación porque inhiben específicamente pasos determinados en la síntesis de proteínas (*véase* Sección 7.15). Por ejemplo, la estreptomicina inhibe la *iniciación* de la cadena proteica, mientras que la puromicina, el cloranfenicol, la cicloheximida y la tetraciclina inhiben la *elongación*. Aun cuando dos antibióticos inhiban el mismo paso en la síntesis de proteínas, los mecanismos de inhibición pueden ser muy diferentes. Por ejemplo, la pueromicina se une al sitio A en el ribosoma y la cadena polipeptídica que se está formando se transfiere a la puromicina en lugar de al complejo aminoácido-RNA de transferencia. El complejo puromicina-péptido se libera entonces del ribosoma, deteniendo la elongación prematuramente. Por el contrario, el cloranfenicol inhibe la elongación bloqueando la formación de la unión peptídica.

Muchos antibióticos inhiben específicamente los ribosomas de los organismos solamente de uno o dos de los dominios filogenéticos. Por ejemplo, el cloranfenicol y la estreptomicina son específicos para los ribosomas de *Bacteria*, mientras que la cicloheximida sólo afecta a los ribosomas de *Eukarya*. Dado que las mitocondrias y los cloroplastos tienen ribosomas de tipo procariótico, los antibióticos que inhiben la síntesis proteica en *Bacteria*, también inhiben dicha síntesis en estos orgánulos (*véase* Sección 14.4). Algunos de estos antibióticos, como la tetraciclina, tienen aplicación clínica porque las mitocondrias eucarióticas no se ven afectadas a las concentraciones que se usan en la terapia antimicrobiana.

Antibióticos que afectan a la RNA polimerasa

Algunos antibióticos inhiben específicamente la síntesis de RNA (*véanse* Sección 7.8 y Figura 20.13). Por ejemplo, las rifamicinas y estreptovaricinas inhiben la síntesis de RNA afectando a la subunidad β de la RNA polimerasa. Estos antibióticos son específicos para *Bacteria*, cloroplastos y mitocondrias. La actinomicina inhibe la síntesis de RNA combinándose con el DNA y bloqueando la elongación del RNA. La actinomicina se une más fuertemente al DNA en los pares guanina-citosina, situándose en el surco principal de la doble cadena donde el RNA se está sintetizando.

Algunos de los antibióticos más utilizados actúan directamente sobre estructuras características, como las paredes celulares, que son específicas de los procariotas. Expondremos algunos de estos antibióticos y sus dianas de acción en la siguiente sección.

✓ 20.7 Revisión de conceptos

Los antibióticos son un grupo químicamente diverso de compuestos bactericidas o bacteriostáticos producidos por diversos microorganismos. La mayoría de los antibióticos actúan inhibiendo la síntesis de proteínas, la transcripción o la síntesis de la pared celular en determinados organismos. Aunque muchos antibióticos tienen aplicación clínica, otros no se usan ni en el hombre ni en los animales.

- ✓ Diferencie *antibióticos* de *análogos de factores de crecimiento*.
- ✓ ¿Qué es un *antibiótico de amplio espectro*?

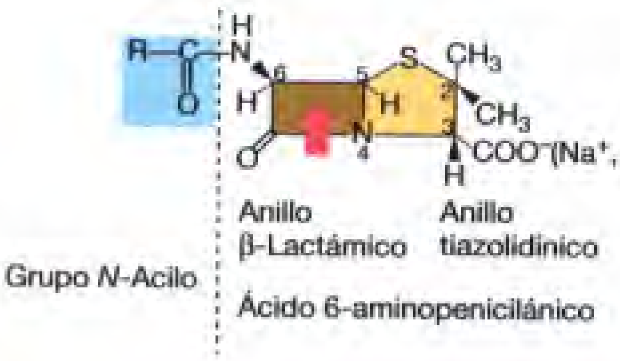
20.8 Antibióticos β-lactámicos: penicilinas y cefalosporinas

Uno de los grupos más importantes de antibióticos, tanto desde el punto de vista histórico como médico, es el grupo β-lactámico. Los **antibióticos β-lactámicos** son las penicilinas, las cefalosporinas y las cefamicinas, todos ellos empleados en medicina. Todos estos antibióticos tienen una estructura característica, el anillo β-lactámico (Figura 20.19). Conjuntamente, las penicilinas y las cefalosporinas constituyen alrededor de la mitad de todos los antibióticos que se producen en el mundo (Figura 20.14). La penicilina es producida por el hongo *Penicillium chrysogenum*, y la cefalosporina por el hongo *Cephalosporium* sp. (*véase* Sección 30.6).

Tipos de penicilinas

El primer antibiótico β-lactámico descubierto, la *penicilina* G (Figura 20.19), es activo frente a *Bacteria* Gram positivas ante todo. Su actividad se restringe a *Bacteria* Gram positivas principalmente porque las *Bacteria* Gram negativas son impermeables al antibiótico. No obstante, las **penicilinas semisintéticas** se han venido desarrollando e introduciendo constantemente, de modo que muchas de ellas son muy eficaces frente a *Bacteria* Gram negativas.

La Figura 20.19 muestra las estructuras complejas de algunas de estas penicilinas nuevas. Las modificaciones en la estructura básica de la penicilina G cambian las propiedades de los antibióticos resultantes. Por ejemplo, la ampicilina y la cerbenicilina son penicilinas semisintéticas que tienen mayor espectro de acción, incluyendo algunas *Bacteria* Gram negativas. Las diferencias estructurales en los grupos *N*-Acilo de estas penicilinas semisintéticas hacen que éstas puedan transportarse al interior de la membrana externa de las Gram negativas (*véase* Sección 4.9), donde inhiben la síntesis de la pared celular. Obsérvese también que la penicilina G es sensible a β-lactamasa, una enzima



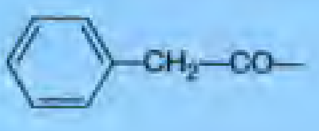
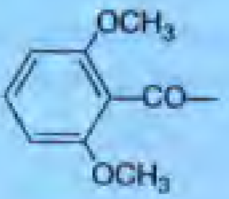
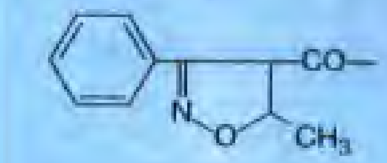
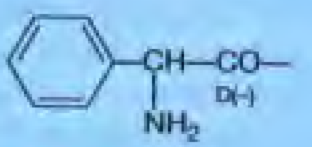
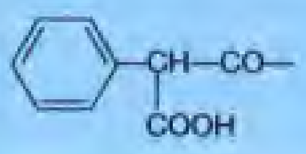
Designación	Grupo *N*-Acilo
PENICILINA NATURAL Benzilpenicilina (penicilina G) Actividad frente a bacterias Gram positivas Sensible a β-lactamasas	
PENICILINAS SEMISINTÉTICAS Meticilina Estable en medio ácido Resistente a β-lactamasas	
Oxacilina Estable en medio ácido Resistente a β-lactamasas	
Ampicilina Espectro de acción ampliado (especialmente frente a bacterias Gram negativas), estable en medio ácido Resistente a β-lactamasas	
Carbenicilina Espectro de acción ampliado (especialmente frente a *Pseudomonas aeruginosa*), estable en medio ácido pero ineficaz por vía oral Sensible a β-lactamasas	

Figura 20.19 Estructuras de algunas penicilinas importantes. La flecha roja (panel superior) muestra el sitio de acción de la mayoría de las β-lactamasas.

producida por numerosas *Bacteria* resistentes a penicilina (*véase* Sección 20.12). Las penicilinas semisintéticas oxacilina y meticilina son muy útiles porque son resistentes a β-lactamasa.

Mecanismos de acción

Los antibióticos β-lactámicos son potentes inhibidores de la síntesis de la pared celular. Como se comentó en las Secciones 4.8 y 6.2, una de las características importantes de la síntesis de la pared celular es la reacción de transpeptidación, que da como resultado el entrecruzamiento de dos cadenas de peptidoglicano. Las enzimas que realizan este paso, las transpeptidasas, también son capaces de unirse a penicilina u otros antibióticos que tengan un anillo β-lactámico. Dichas transpeptidasas se denominan *proteínas que unen penicilina* (PBPs, *penicillin binding proteins*). Las PBPs se unen muy fuertemente a la penicilina y ya no pueden catalizar la reacción de transpeptidación. La pared celular continúa formándose pero ya no se entrecruza y se debilita progresivamente a medida que el esqueleto de peptidoglicano se va depositando. Además, el complejo antibiótico PBP estimula la liberación de autolisinas que digieren la pared celular existente. Como resultado la pared celular se debilita y finalmente se degrada. En condiciones normales, las diferencias de presión osmótica entre el interior de la célula y el exterior lisan la célula. A diferencia de la penicilina, la vancomicina, un glicopéptido (Figura 20.12), no se une a PBPs pero actúa directamente en el péptido terminal D-alaninaD-alanina en los precursores del peptidoglicano (*véase* Sección 6.2), bloqueando la transpeptidación. Dado que la pared celular y su mecanismo de síntesis son únicos de *Bacteria*, los antibióticos β-lactámicos tienen una especificidad muy elevada y nos son tóxicos para las células del hospedador. Sin embargo, debido a las configuraciones estructurales complejas de estos antibióticos, algunas personas desarrollan alergias importantes a algunos componentes β-lactámicos después de tratamientos repetidos con esta terapia antibiótica. Estas alergias pueden poner en peligro la vida de las personas que las padecen (*véase* Sección 22.13).

Cefalosporinas

Las cefalosporinas son otro grupo de antibióticos con importancia clínica que también contienen el anillo β-lactámico. Difieren estructuralmente de las penicilinas en que tienen un anillo dihidrotiazínico de 6 átomos, en lugar del anillo tiazolidínico de 5 átomos de las penicilinas. Las cefalosporinas tienen el mismo mecanismo de acción que las penicilinas; es decir, se unen irreversiblemente a las PBPs e impiden el entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglicano. Las cefalosporinas importantes en medicina son antibióticos semisintéticos que generalmente tienen un espectro de acción más amplio que las penicilinas y, a menudo, son más resistentes a las enzimas que destruyen los anillos β-lactámicos, las β-lactamasas. La ceftriaxona por ejemplo, (Figura 20.12), una cefalosporina de 3ª generación ampliamente utilizada, es muy resistente a las β-lactamasas y, actualmente, ha remplazado a la penicilina como antibiótico de elección en el tratamiento de las infecciones debidas a *Neisseria gonorrhoeae* (*véanse* Sección 20.12 y Sección 26.12), dado que muchas cepas de *N. gonorrhoeae* han desarrollado β-lactamasas que cortan el anillo β-lactámico de las penicilinas.

✓ 20.8 Revisión de conceptos

Los compuestos β-lactámicos son los antibióticos más importantes usados en clínica. Este grupo incluye las penicilinas y las cefalosporinas. Dichos antibióticos son específicos para las enzimas que catalizan la síntesis de la pared celular de *Bacteria* y, como grupo, son muy poco tóxicos para el hospedador y tienen un espectro de acción muy amplio.

- ✓ Dibuje la estructura del anillo β-lactámico.
- ✓ ¿Cómo actúan los antibióticos β-lactámicos?

20.9 Antibióticos producidos por procariotas

Muchos antibióticos son activos frente a procariotas pero también son producidos por procariotas. Tal es el caso de los aminoglicósidos, los macrólidos y las tetraciclinas. Muchos de estos antibióticos tienen importantes aplicaciones clínicas y por ello trataremos sus propiedades generales aquí.

Aminoglicósidos

Los **aminoglicósidos** son antibióticos que contienen aminoazúcares unidos por enlaces glicosídicos (*véase* Sección 3.3) a otros aminoazúcares. Muchos antibióticos usados en medicina son aminoglicósidos, como la *estreptomicina* (Figura 20.12) y sus compuestos relacionados, la *kanamicina* (Figura 20.20), la *gentamicina* y la *neomicina*. Los aminoglicósidos actúan inhibiendo la síntesis de proteínas en la subunidad 30S del ribosoma (Figura 20.13). Los antibióticos aminoglicosídicos se utilizan en clínica frente a *Bacteria* Gram negativas. La estreptomicina también se ha usado ampliamente en el tratamiento de la tuberculosis. Históricamente, la utilización de la estreptomicina para el tratamiento de la tuberculosis supuso un importante avance médico, ya que fue el primer antibiótico capaz de controlar dicha enfermedad infecciosa. Sin embargo, ninguno de los amiglicósidos se usa de forma generalizada actualmente y, en total, sólo suponen el 3% aproximadamente de todos los antibióticos producidos y usados (Figura 20.14). La estreptomicina ha sido remplazada por varios compuestos químicos sintéticos en el tratamiento de la tuberculosis, porque produce importantes efectos adversos y rápidamente aparece resistencia bacteriana. El empleo de aminoglicósidos en el tratamiento de infecciones por Gram negativos ha descendido debido al desarrollo de penicilinas semisintéticas (*véase* Sección 20.8) y a las tetraciclinas (*véase* más adelante en esta sección). Actualmente se considera los aminoglicósidos como antibióticos de reserva para usarse principalmente cuando otros antibióticos dejan de ser activos.

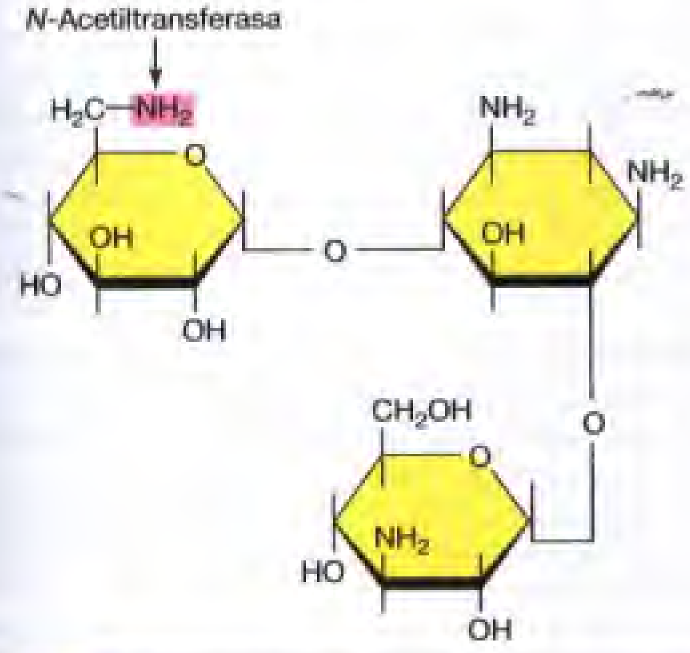


Figura 20.20 Estructura de la kanamicina, un antibiótico aminoglicósido. Los aminoazúcares se muestran en amarillo. Se indica el sitio de modificación por una *N*-acetiltransferasa, codificada en un plásmido de resistencia.

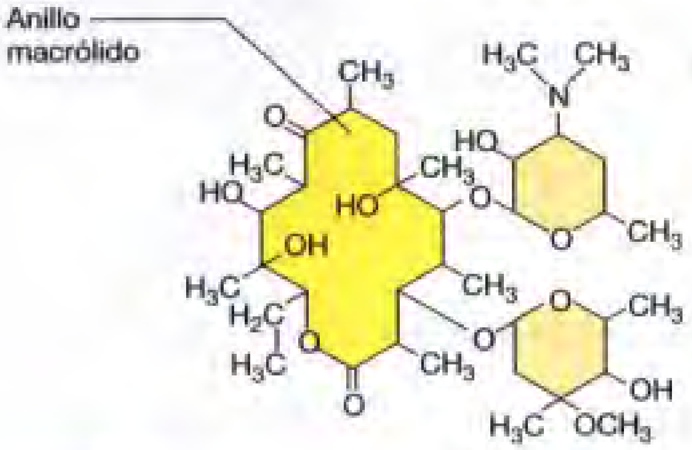


Figura 20.21 Estructura de la eritromicina, un antibiótico macrólido.

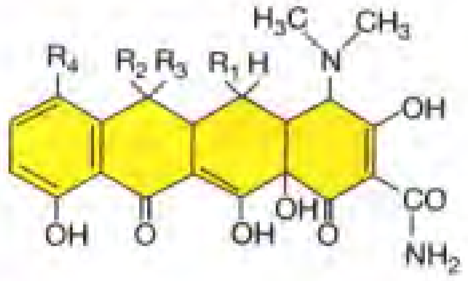
Macrólidos

Los **macrólidos** contienen grandes anillos lactona unidos a residuos de azúcar (Figura 20.21). Se dispone de variaciones tanto en el anillo macrólido como en los residuos de azúcar, por lo que existe una gran variedad de estos antibióticos. El macrólido mejor conocido es la *eritromicina*, pero también la *oleandomicina*, la *espiramicina* y la *tilosina*. Todos los macrólidos suponen el 11% de la producción mundial de antibióticos con aplicación en clínica (Figura 20.14). La eritromicina actúa como inhibidor de la síntesis de proteínas en la subunidad 50S del ribosoma (Figura 20.13). Clínicamente, la eritromicina se utiliza en lugar de la penicilina en pacientes alérgicos a la penicilina u otros antibióticos β-lactámicos. La eritromicina es especialmente útil en el tratamiento de la legionelosis (*véase* Sección 28.7), dado que *Legionella pneumophila* es sensible a este antibiótico.

Tetraciclinas

Las **tetraciclinas** son un grupo importante de antibióticos de amplia aplicación médica en humanos. Fueron algunos de los primeros antibióticos de amplio espectro e inhiben casi todas las *Bacteria* Gram positivas y Gram negativas. La estructura básica de las tetraciclinas consiste en un sistema de anillos de naftaceno (Figura 20.20). La estructura básica del anillo de naftaceno puede estar sustituida en diferentes posiciones para dar lugar a nuevos análogos de tetraciclina. La *clortetraciclina*, por ejemplo, tiene un átomo de cloro, mientras que la *oxitetraciclina* tiene un grupo hidroxilo (OH) adicional y no tiene cloro (Figura 20.22). Estos tres antibióticos se producen microbiológicamente, pero también hay tetraciclinas semisintéticas con sustituciones sintéticas en el sistema de anillos de naftaceno. Como la eritromicina y los aminoglicósidos, la tetraciclina es un inhibidor de la síntesis de proteínas; interfiere con la función de la subunidad 30S del ribosoma (*véase* Figura 20.13).

Las tetraciclinas y los antibióticos β-lactámicos son dos de los grupos de antibióticos más importantes utilizados en clínica. Las tetraciclinas también se emplean en veterinaria y, en algunos países, como suplemento nutricional para pollos y cerdos. Dado que el empleo abusivo de los antibióticos, importantes en medicina, con otros fines además del clínico ha dado lugar a la aparición generalizada de resistencias a antibióticos, actualmente de desaconseja su utilización con otro fin que no sea el médico (*véase* Sección 20.12).



Análogo de la tetraciclina	R_1	R_2	R_3	R_4
Tetraciclina	H	OH	CH_3	H
7-Clortetraciclina (aureomicina)	H	OH	CH_3	Cl
5-Oxitetraciclina (terramicina)	OH	OH	CH_3	H

Figura 20.22 Estructura de la tetraciclina y otros análogos semisintéticos importantes.

✓ 20.9 Revisión de conceptos

Los aminoglicósidos, macrólidos y tetraciclinas son moléculas estructuralmente complejas producidas por procariotas, y son activos frente a otros procariotas. La eritromicina y varias tetraciclinas se usan ampliamente en medicina clínica.

- ✓ ¿Cuáles son las fuentes biológicas de los aminoglicósidos, tetraciclinas y macrólidos?
- ✓ ¿Cuál es el mecanismo de acción de cada una de estas tres clases de antibióticos?

IV CONTROL DE VIRUS Y DE PATÓGENOS EUCARIÓTICOS

Los fármacos que controlan el crecimiento de los virus y de los patógenos eucarióticos, como los hongos, a menudo afectan a las células del hospedador eucariótico. Como consecuencia, sólo los compuestos que afectan preferentemente a las rutas metabólicas específicas del patógeno o sus componentes estructurales son útiles para tratar estas infecciones. Existe un número limitado de dichos fármacos y aquí expondremos el mecanismo de acción de algunos de ellos.

20.10 Antivíricos

Los virus usan sus hospedadores eucarióticos para reproducirse y realizar sus funciones metabólicas (*véase* Capítulo 9). Dado que el hospedador y el virus utilizan la maquinaria metabólica y de reproducción, y las estructuras del hospedador, los esfuerzos por controlar los virus con fármacos frecuentemente son tóxicos para el hospedador. No obstante, algunos agentes son más tóxicos para los virus que para el hospedador, y algunos agentes producidos por el hospedador específicamente actúan sobre los virus.

Quimioterápicos antivíricos

Dado que las funciones y las estructuras víricas están tan integradas en las funciones de la célula del hospedador, con los agentes antivíricos no se ha alcanzado el mismo éxito que el obtenido en la terapia contra las bacterias, con antibióticos muy selectivos; sin embargo, gracias al esfuerzo realizado por encontrar medidas eficaces para controlar el SIDA (*véase* Sección 26.14), se han conseguido algunos logros importantes en el control de virus con agentes químicos (Tabla 20.5).

Los agentes más eficaces y utilizados en la quimioterapia antivírica son análogos de nucleósidos (Tabla 20.5). El primer compuesto que tuvo una aceptación general en esta categoría fue la zidovudina, o azidotimidina (AZT). El AZT inhibe los retrovirus tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), el agente etiológico del SIDA (*véase* Figura 26.38). La azidotimidina está relacionada químicamente con la timidina pero es un derivado didesoxi-, que carece del grupo hidroxilo 3'. El AZT inhibe la multiplicación de los retrovirus bloqueando la síntesis del DNA intermediario (transcripción reversa) y esto lleva a la inhibición eficaz de la multiplicación del HIV. Se han desarrollado otros análogos de nucleósidos para el tratamiento del HIV, con mecanismos similares, como se muestra en la Tabla 20.5. Casi todos los análogos de nucleósidos, o *nucleósidos inhibidores de la transcriptasa reversa* (**NRTI**, *nucleoside reverse transcriptase inhibitors*), tienen el mismo mecanismo de acción: inhiben la elongación de la cadena del ácido nucleico del virus a nivel de la polimerasa de ácidos nucleicos de la célula hospedadora. Debido a que la diana de acción es la función replicativa normal de la célula hospedadora, estos compuestos casi siempre son tóxicos para el hospedador; otros pierden su potencia antivírica con el tiempo por la emergencia de virus resistentes a antivíricos (*véase* Sección 26.14). El *análogo de nucleótido* cidovir funciona del mismo modo (Tabla 20.5).

Otros compuestos químicos actúan a nivel de la polimerasa vírica. Éstos son la nevirapina, un inhibidor no-nucleósido de la transcriptasa reversa que se une directamente a la transcriptasa reversa e inhibe su acción posterior; el ácido fosfonofórmico, que actúa como un análogo del fosfato inorgánico, inhibiendo el enlace internucleotídico; y la rifamicina, un antibiótico que se une e inhibe a la RNA polimerasa.

Una clase relativamente nueva de fármacos antivíricos son los **inhibidores de la proteasa (PI)** (Tabla 20.5). Estos fármacos son especialmente efectivos en el tratamiento de HIV. Evitan la infección uniéndose al sitio activo de la proteasa del HIV, inhibiendo el procesamiento de los polipéptidos víricos y la maduración de los virus (*véanse* Sección 26.14 y Sección 20.13).

Interferón

Los **interferones** son sustancias antivíricas producidas por muchas células animales en respuesta a la infección por ciertos virus. Son proteínas de bajo peso molecular

TABLA 20.5 Compuestos quimioterapéuticos antivíricos

Categoría/medicamento	Mecanismo de acción	Virus afectado
Análogos de nucleósidos		
Aciclovir	Inhibidores de la polimerasa vírica	Herpesvirus, *Varicella-Zoster*
Ganciclovir		Citomegalovirus
Trifluoridina		Herpesvirus
Valaciclovir		Herpesvirus
Vidarabina		Herpesvirus, virus vaccinia, virus de la hepatitis B
Didanosina (didesoxiinosina o ddI)	Inhibidores de la transcriptasa reversa	HIV[a]
Lamivudina (3TC)		HIV, virus de la hepatitis B
Estavudina (d4T)		HIV
Zalcitabina (ddC)		HIV
Zidovudina (AZT) (*véase* Figura 26.28)		HIV
Ribavirina	Bloquea el RNA vírico (*capping*)	Virus respiratorio sincital, influenzavirus A y B, virus Lassa
Aminas sintéticas		
Amantadina	Bloquea la decapsidación del virus	Influenzavirus A
Rimantadina		Influenzavirus A
Análogo de nucleótidos		
Cidofovir	Inhibidor de la polimerasa vírica	Citomegalovirus, herpesvirus
Análogo de fosfato		
Ácido fosfonofórmico (Foscarnet)	Inhibidor de la polimerasa vírica	Herpesvirus, HIV, virus de la hepatitis B
Inhibidor no nucleosídico de la transcriptasa reversa (NNRTI)		
Nevirapina	Inhibidor de la transcriptasa reversa	HIV
Inhibidor de la RNA polimerasa		
Rifamicina	Inhibidor de la RNA polimerasa	Poxvirus, virus vaccinia
Inhibidor de la proteasa		
Indinavir (Figura 20.27)	Inhibidor de la proteasa	HIV
Ritonavir		HIV
Saquinavir (Figura 20.27)		HIV
Nelfinavir		HIV
Abacivir		HIV
Lopinavir		HIV
Interferones		
Interferón α	Induce las proteínas que inhiben la replicación vírica	Amplio espectro (específico del hospedador)
Interferón β		
Interferón γ		

[a] Virus de la inmunodeficiencia humana.

(17 000 Dalton) que impiden la multiplicación vírica en células normales estimulando la producción de proteínas antivíricas. Los interferones de las células infectadas por virus interaccionan con los receptores de las células no infectadas y promueven la síntesis de las proteínas antivíricas que impiden la posterior infección del virus. Existen tres tipos de moléculas: IFN-α (interferón α), producido por leucocitos; IFN-β (interferón β), producido por fibroblastos; y IFN-γ (interferón γ), producido por células del sistema inmunitario llamadas linfocitos (*véase* Sección 23.10). Estos tres tipos son inhibidores víricos eficaces. Inicialmente fueron descubiertos durante el estudio de la interferencia vírica, fenómeno en el que la infección con un virus interfiere con la infección posterior por otro virus, de ahí el apelativo de *interferón*. Los interferones se sintetizan en respuesta a virus, ácidos nucleicos víricos y virus inactivados por radiación. El interferón se produce en mayor cantidad en células infectadas con virus poco virulentos (virulencia baja), pero se produce poco frente a virus muy virulentos. Parece ser que estos últimos (virus muy virulentos) inhiben la síntesis proteica de la célula antes de que se produzca cualquier interferón. La síntesis de interferón también se induce por varias moléculas de RNA de doble cadena, naturales o sintéticas. Dado que el RNA de doble cadena no existe en células no infectadas, aunque sí como forma replicativa en la células infectadas por virus, la presencia de RNA de doble cadena puede servir como señal de infección vírica en la célula animal y estimular el sistema de producción de interferón.

Los interferones no son específicos del virus sino del *hospedador*. El interferón producido por un miembro de una especie reconoce los receptores específicos sólo en células de la misma especie; por tanto, el interferón que produce un tipo de animal (por ejemplo, el pollo) en respuesta al virus de la influenza inhibe la multiplicación de otros virus en la misma especie, pero no tiene ningún efecto sobre la multiplicación de ningún virus en otras especies animales.

Los interferones son interesantes como posibles antivíricos y agentes anticancerígenos. Actualmente se dispone de varias preparaciones de interferones recombinantes aprobadas. No obstante, la utilización de los interferones como agentes quimioterapéuticos generales no está muy extendida porque el interferón debe administrarse localmente, en concentraciones elevadas, para que estimule la producción de las proteínas antivíricas en las células no infectadas del hospedador. Por tanto, la utilidad clínica de estos agentes antivíricos depende de la posibilidad de suministrar el interferón en áreas localizadas del hospedador mediante inyecciones o aerosoles. Por otra parte, las señales de estimulación propias del interferón (*i.e.*, la estimulación con ácidos nucleicos, virus atenuados (no virulentos) e incluso nucleótidos sintéticos) que se den a las células del hospedador previamente a la infección vírica podrían conseguir la misma finalidad.

✓ 20.10 Revisión de conceptos

Los virus utilizan la maquinaria metabólica y biosintética de la célula hospedadora para replicarse; sin embargo, varias enzimas víricas específicas y algunos procesos pueden inhibirse con agentes quimioterapéuticos que interrumpen la replicación vírica. Los antivíricos clínicamente eficaces son análogos de nucleósidos que actúan inhibiendo las polimerasas de los nucleótidos víricos. Otros agentes, como los inhibidores de la proteasa, interfieren con los procesos de maduración de los virus. Las células del hospedador también producen proteínas antivíricas llamadas *interferones*, que detienen la replicación vírica.

- ✓ ¿Por qué hay tan pocos antivíricos eficaces?
- ✓ ¿Qué pasos del proceso de maduración del virus inhiben los análogos de nucleósidos?, ¿y los inhibidores de la proteasa?, ¿y los interferones?

20.11 Antifúngicos

Como los virus, la quimioterapia eficaz de los hongos también plantea problemas especiales. Dado que los hongos pertenecen al dominio *Eukarya*, la mayor parte de su maquinaria celular es la misma del hombre y los animales, por lo que los agentes quimioterapéuticos que afectan rutas metabólicas en hongos a menudo interfieren con las correspondientes rutas en las células hospedadoras; de ahí la toxicidad de estos medicamentos. Por esta razón, muchos antifúngicos sólo pueden administrarse por vía tópica (superficial). No obstante, algunos fármacos son selectivamente tóxicos para los hongos. Los medicamentos para el tratamiento antifúngico van adquiriendo mayor importancia a medida que las infecciones fúngicas en individuos inmunosuprimidos van siendo más graves (*véanse* Secciones 26.14 y 27.7). A continuación, consideraremos detalladamente la toxicidad selectiva de algunos tipos de compuestos químicos eficaces frente a hongos.

Inhibidores del ergosterol

Dos grupos principales de compuestos antifúngicos actúan interfiriendo con el ergosterol o inhibiendo su síntesis (Tabla 20.6). En la mayoría de los hongos, el ergosterol reemplaza el colesterol que se encuentra en las membranas de las células de eucariotas superiores (*véase* Sección 4.5). En el primer grupo se encuentran los *polienos*, un grupo de antibióticos producidos por la bacteria *Streptomyces polyenes*. Los polienos se unen al ergosterol, que interfiere con la función de la membrana y finalmente produce la permeabilización de la membrana y la muerte de la célula (Figura 20.23). Un segundo grupo importante de antifúngicos lo constituyen los *azoles* y las *alilaminas*, agentes que inhiben selectivamente la biosíntesis del ergosterol, por lo que tienen un amplio espectro de acción antifúngica. El tratamiento con azoles se refleja en la incapacidad para producir una membrana normal, lo que conduce a una lesión en la membrana y la alteración de las actividades críticas de la membrana como el transporte de nutrientes. Las alilaminas también inhiben la biosíntesis del ergosterol, pero sólo son útiles por vía tópica, porque no son incorporadas fácilmente por las células y tejidos animales.

Otros antifúngicos

Otros medicamentos antifúngicos interfieren con estructuras y funciones específicamente fúngicas (Tabla 20.6). Por ejemplo, la mayoría de las paredes celulares contienen *quitina*, un polímero de N-acetilglucosamina que se encuen-

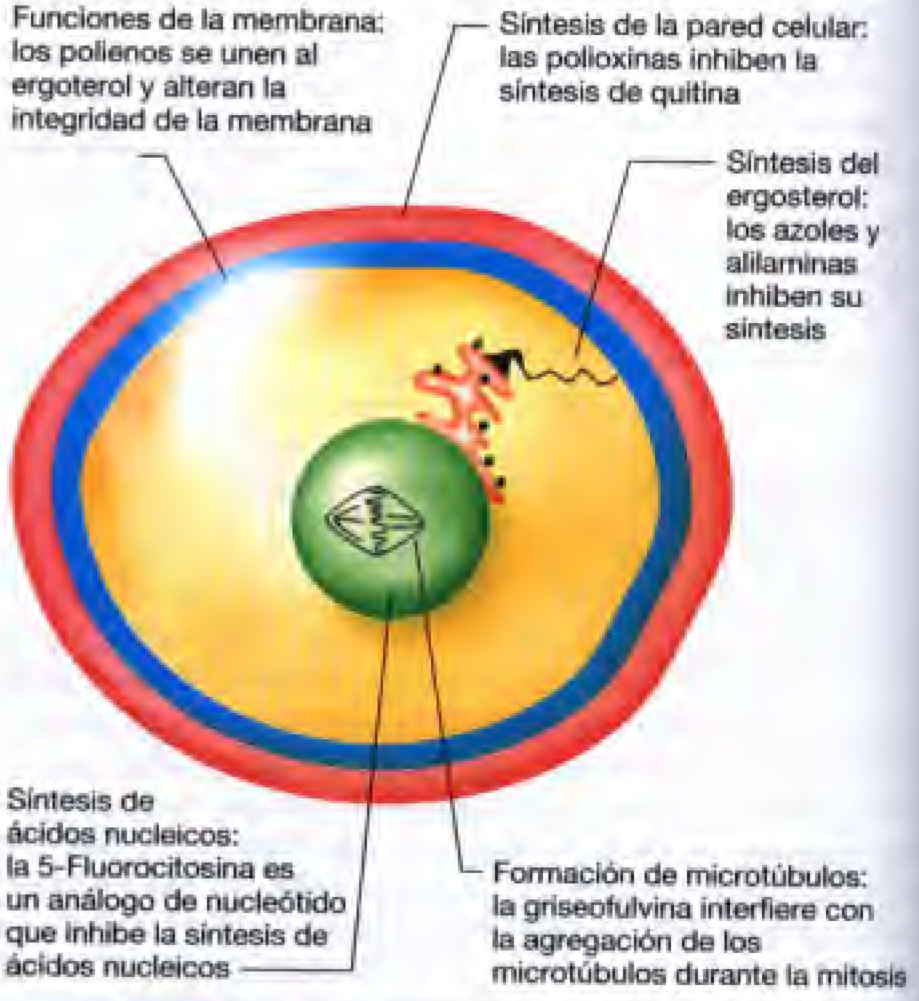

Funciones de la membrana: los polienos se unen al ergoterol y alteran la integridad de la membrana
Síntesis de la pared celular: las polioxinas inhiben la síntesis de quitina
Síntesis del ergosterol: los azoles y alilaminas inhiben su síntesis
Síntesis de ácidos nucleicos: la 5-Fluorocitosina es un análogo de nucleótido que inhibe la síntesis de ácidos nucleicos
Formación de microtúbulos: la griseofulvina interfiere con la agregación de los microtúbulos durante la mitosis

Figura 20.23 Dianas de acción de algunos agentes quimioterapéuticos antifúngicos. Dado que los hongos son células eucarióticas, los antibióticos antibacterianos generalmente son ineficaces (frente a hongos).

TABLA 20.6 Compuestos antifúngicos (fungicidas)

Categoría	Diana de acción	Ejemplos	Uso
Polienos	Síntesis de ergosterol	Amfotericina B	Vía oral
Análogos de ácidos nucleicos	Síntesis de DNA	5-Fluorocitosina	Vía oral
Polioxinas	Síntesis de quitina	Polioxina A	Agricultura
		Polioxina B	Agricultura
Azoles	Síntesis de ergosterol	Fluconazol	Vía oral
		Itraconazol	Vía oral
		Ketoconazol	Vía oral
		Clotrimazol	Vía tópica
		Miconazol	Vía tópica
		Voriconazol	Vía oral
Alilaminas	Síntesis de ergosterol	Terbenafina	Vía oral

tra únicamente en hongos e insectos (*véase* Sección 17.25). Varias *polioxinas* inhiben la síntesis de la pared celular interfiriendo con la biosíntesis de la quitina. Aunque las polioxinas se usan como fungicidas en agricultura, ninguno de los inhibidores de la síntesis de quitina se utiliza en clínica. Otros fármacos inhiben la biosíntesis del folato, interfieren con la topología del DNA durante la replicación o, como la *griseofulvina*, interfieren con la agregación de los microtúbulos durante la mitosis (*véase* Sección 7.6). El análogo del ácido nucleico *5-fluorocitosina* es un inhibidor eficaz de la síntesis de ácidos nucleicos en hongos. Algunos antifúngicos muy efectivos también tienen otras aplicaciones; por ejemplo, la *vincristina*, la *vinblastina* y el *toxol*, son eficaces antifúngicos y también tienen propiedades anticancerígenas.

Desafortunadamente y como se preveía, el empleo de antifúngicos ha dado como resultado la aparición de poblaciones de hongos resistentes y la emergencia de «nuevos» patógenos fúngicos. Por ejemplo, especies de *Candida* que habitualmente no son patógenas, ahora producen enfermedades en individuos que habían sido tratados con antifúngicos. Estas *Candida* patógenas resistentes a antifúngicos no pueden tratarse con ninguno de los antifúngicos que se usan en la actualidad.

A medida que la utilización de quimioterápicos aumente, tanto antibacterianos como antifúngicos, también aumentarán las posibilidades de infecciones fúngicas oportunistas y la necesidad correspondiente de contar con nuevos agentes específicos para el control de los hongos.

✓ 20.11 Revisión de conceptos

Los antifúngicos se clasifican en dos amplias variedades de categorías químicas. Como para los antivíricos, es difícil conseguir una toxicidad selectiva en antifúngicos; pero existen algunos quimioterápicos eficaces. El tratamiento de las infecciones fúngicas es uno de los retos sanitarios emergentes.

- ✓ ¿Por qué hay muy pocos antibióticos antifúngicos que sean eficaces clínicamente?
- ✓ ¿Qué factores contribuyen al aparente aumento de las infecciones fúngicas?

V RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS Y DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS ANTIMICROBIANOS

La resistencia a los antimicrobianos es uno de los principales problemas cuando se trata con muchos de los microorganismos patógenos comunes. Aquí exploraremos algunas de las razones de dicha resistencia y presentaremos algunas de las estrategias seguidas para superar esa resistencia.

20.12 Resistencia a antimicrobianos

La **resistencia a antimicrobianos** es la capacidad adquirida de un organismo para resistir los efectos de un agente quimioterapéutico al que es sensible habitualmente. La mayor parte de la resistencia a antimicrobianos es debida a *genes de resistencia* que se transfieren por intercambio genético. Para protegerse, los productores de antibióticos desarrollan mecanismos de resistencia que neutralizan o destruyen sus propios antibióticos; los genes que codifican dichos mecanismos de resistencia pueden transferirse ocasionalmente a otros organismos.

Mecanismos de resistencia

No todos los antibióticos actúan frente a todos los microorganismos. Algunos microorganismos son *naturalmente resistentes* (de forma natural) a algunos antibióticos. Hay varias razones por las que los microorganismos pueden tener una resistencia inherente a un antibiótico: (1) El organismo puede carecer de la estructura que inhibe el antibiótico; por ejemplo, algunas bacterias como los micoplasmas, carecen de una pared celular típica, por lo que son resistentes a las penicilinas. (2) El organismo puede ser impermeable al antibiótico; por ejemplo, la mayoría de las *Bacteria* Gram negativas son impermeables a la penicilina G. (3) El organismo puede alterar el antibiótico inactivándolo. Muchos estafilococos producen β-lactamasas que rompen el anillo β-lactámico de la mayoría de las penicilinas (Figura 20.24).

(4) El organismo puede modificar la *diana* del antibiótico. (5) Por un cambio genético, la alteración puede tener lugar en una ruta metabólica que bloquea el antimicrobiano. El organismo desarrolla entonces una ruta bioquímica resistente; por ejemplo, muchos patógenos desarrollan resistencia a sulfonamidas (*véanse* Sección 20.6 y Figura 20.16). La sulfonamidas inhiben la producción de ácido fólico en *Bacteria*, pero las *Bacteria* resistentes modifican su metabolismo incorporando el ácido fólico ya sintetizado del medio, obviando así la necesidad de una ruta que pueda ser bloqueada por las sulfonamidas. (6) El organismo puede ser capaz de bombear hacia fuera un antibiótico que haya entrado en la célula (eflujo) (caso de la tetraciclina). Algunos ejemplos de resistencia bacteriana a antibióticos se muestran en la Tabla 20.7.

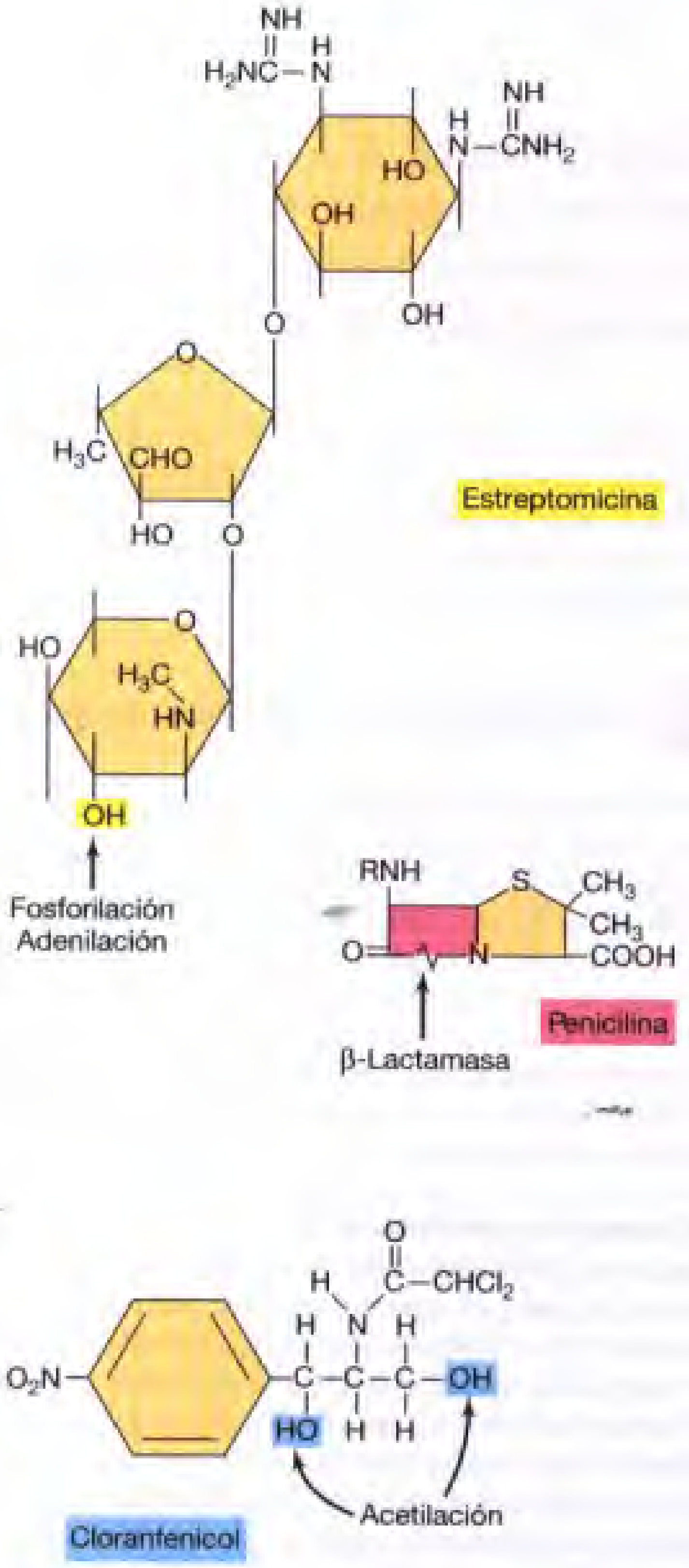


Figura 20.24 Sitios en los que los antibióticos son atacados por enzimas codificadas por genes en plásmidos R. En los antibióticos aminoglicosídicos relacionados con la estreptomicina y que posean un grupo amino libre, la inactivación tiene lugar por *N*-acetilación (*véase* también Figura 20.20).

Como se vio en la Sección 10.8, la resistencia a antibióticos puede ser genéticamente codificada por el microorganismo, bien en el cromosoma, bien en plásmidos, en los llamados *plásmidos de resistencia (factores R)*; los tipos específicos de resistencia tienen su base genética en una u otra localización (Tabla 20.7). Debido a la aparición de resistencias a antibióticos, debe determinarse la sensibilidad a antibióticos de las bacterias aisladas de muestras clínicas, usando para ello el método de la concentración mínima inhibitoria (CMI) o el método de difusión en agar (Sección 20.4 y Figuras 20.10 y 20.11). Los detalles sobre los tests de sensibilidad de los aislamientos clínicos se describen en la Sección 23.3.

Mecanismos de resistencia mediados por plásmidos R

En el *laboratorio*, frecuentemente se aíslan células resistentes a antibióticos a partir de cultivos que fueron sensibles a antibióticos. La resistencia de estos aislamientos suele deberse a mutaciones en *genes cromosómicos*. Por otra parte, la mayoría de las bacterias resistentes a antibióticos aisladas de *pacientes* poseen los genes de resistencia en plásmidos R. El mecanismo de resistencia del plásmido R es diferente del de la resistencia cromosómica. En la mayoría de los casos, la resistencia a antibióticos mediada por genes cromosómicos aparece como una modificación de la *diana* de acción del antibiótico (por ejemplo, un ribosoma).

Por el contrario, en la mayoría de los casos la resistencia plasmídica R se debe a la presencia en el plásmido R de genes que codifican nuevas enzimas que *inactivan* el fármaco (Figura 20.24) o de genes que codifican enzimas que impiden la incorporación del antibiótico o lo bombean fuera de la célula. Por ejemplo, una serie de antibióticos tiene estructuras químicas similares con unidades aminoglicosídicas. Entre los antibióticos aminoglicósidos están la estreptomicina, la neomicina, la kanamicina y la espectinimicina. Las cepas que tienen plásmidos R contienen enzimas que modifican químicamente los antibióticos, bien por fosforilación, acetilación o adenilación. El fármaco modificado carece entonces de actividad antibiótica. En el caso de las penicilinas, la resistencia plasmídica R se debe a la formación de penicilinasa (*β*-lactamasa), que rompe el anillo *β*-lactámico. La resistencia al cloranfenicol mediada por plásmido R surge por la presencia de una enzima que acetila el antibiótico. Muchos plásmidos R confieren resistencia a múltiples antibióticos porque un único plásmido R puede contener varios genes diferentes, cada uno de los cuáles codifica una enzima diferente que inactiva al antibiótico.

Origen de los plásmidos de resistencia

Aunque no se dispone de una prueba específica sobre el origen de los plásmidos R de resistencia a múltiples antibióticos, varios hechos circunstanciales sugieren que los plásmidos R existieron antes de la era de los antibióticos. El uso generalizado de los antibióticos crea las condiciones selectivas para la dispersión de los plásmidos R con uno o más genes de resistencia (*véase* el recuadro, «Usos no médicos de

TABLA 20.7 Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos

Mecanismo de resistencia	Ejemplo de antibiótico	Base genérica de la resistencia	Mecanismo presente en:
Permeabilidad reducida	Penicilinas	Cromosómica	*Pseudomonas aeruginosa* *Bacteria* entéricas
Inactivación del antibiótico (por ejemplo, penicilinasa; enzimas modificadoras como metilasas, acetilasas, y fosforilasas; y otros)	Penicilinas	Plasmídica y cromosómica	*Staphylococcus aureus* *Bacteria* entéricas *Neisseria gonorrhoeae*
	Cloranfenicol	Plasmídica y cromosómica	*Staphylococcus aureus* *Bacteria* entéricas
	Aminoglicósidos	Plasmídica	*Staphylococcus aureus*
Alteración de la diana (por ejemplo, RNA polimerasa, rifamicina; ribosoma, eritromicina y estreptomicina; DNA girasa, quinolonas)	Eritromicina	Cromosómica	*Staphylococcus aureus*
	Rifamicina		*Bacteria* entéricas
	Estreptomicina		*Bacteria* entéricas
	Norfloxacino		*Bacteria* entéricas *Staphylococcus aureus*
Desarrollo de una ruta bioquímica resistente	Sulfonamidas	Cromosómica	*Bacteria* entéricas *Staphylococcus aureus*
Eflujo (bombeo hacia el exterior de la célula)	Tetraciclinas	Plasmídica	*Bacteria* entéricas
	Cloranfenicol	Cromosómica	*Staphylococcus aureus* *Bacillus subtilis*

Atención a ... Usos no médicos de los antibióticos

Los antibióticos han venido siendo ampliamente utlizados con otros fines que los médicos en Estados Unidos y otros paises desarrollados, como suplementos de los piensos en la alimentación de los animales. La adición de pequeñas cantidades de antibióticos a los piensos estimula el crecimiento de los animales, acortando el periodo requerido para la venta de los mimos. Por ejemplo, la adición de unos 55 miligramos (mg) de penicilina por kilo de pienso para pollos (25 mg de penicilina por libra de pienso), ahorra al año unos 900 millones por kg (2000 millones por lb) de pienso, porque el aumento de peso es más rápido y la eficiencia de la alimentación es mayor. Probablemente los antibióticos actúan inhiendo las infecciones leves y reduciendo la inflamación intestinal resultante, lo que permite una mayor absorción de los nutrientes. Los estudios realizados con animales libres de microorganismos confirman esta idea; el crecimiento de los animales libres de microorganismos no se acelera con piensos suplementados con antibióticos.

Lamentablemente, bajos niveles de antibióticos en la alimentación animal seleccionan microorganismos resistentes a los antibióticos, debido a la exposición constante a los mismos. Estudios moleculares en *Salmonella* aislada de pollos, han demostrado que la resistencia se transfiere rápidamente entre diferentes especies bacterianas e incluso entre diferentes géneros en el intestino. En otro estudio, alrededor del 80% de las cepas de *Salmonella* aisladas de carnes en los supermercados fueron resistentes al menos a un antibiótico, y las cepas más resistentes adquirieron al menos tres genes de resistencia. Los estudios con microorganismos aislados de las personas que trabajan en la cría de animales han puesto de manifiesto que muchas cepas del hombre han adquirido resistencia a los antimicrobianos que se usan en la alimentación animal. Por tanto, la utilización de antibióticos en los piensos expande la cantidad de microorganismos resistentes a los antibióticos que pueden infectar al hombre.

Otro estudio indica que algunas cepas de *Enterococcus faecacium*, ya resistentes a la mayoría de los antibióticos, adquirieron resistencia al Synercid, un medicamento relativamente nuevo usado selectivamente en el tratamiento de las infecciones humanas resistentes a los antibióticos, en los dos años transcurridos desde que fue aprobado por la Administración Federal de los Medicamentos (EE.UU). [N. de la T., Synercid: asociación de quinupristina (estreptogramina B) con dalfopristina (estreptogramina A) en proporción 30/70. Ambos se unen a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano e inhiben la síntesis proteica]. Los investigadores especulan sobre la posibilidad de que las cepas resistentes provengan del ganado tratado con un análogo del Synercid, ¡durante los últimos veinticinco años!

Por desgracia, los estudios a largo plazo en animales previamente alimentados con antibióticos y posteriormente sometidos a dietas sin ellos han demostrado que las bacterias resistentes a los antibióticos no desaparecen rápidamente del intestino. Los genes de resistencia están integrados en plásmidos estables o en cromosomas de la microbiota intestinal y, en ausencia de fuerzas de contraselección, se mantendrán durante algún tiempo, aun cuando se suspenda la alimentación con piensos suplementados con antibióticos. Como consecuencia, la utilización con otra finalidad que no sea la estrictamente médica de los antibióticos ha venido a confirmar una simple lección en ecología microbiana: el ambiente selecciona las especies mejor adaptadas. No obstante, con el deseo de reducir la expansión de resistencias a los antibióticos en Europa, algunos paises europeos han prohibido el empleo en piensos animales de los antibióticos usados en clínica. La Organización Mundial de la Salud (OMS) también ha redactado un documento en contra de la utilización de antibióticos en la alimentación animal. En Estados Unidos, grandes cantidades de antibióticos continúan usándose en las granjas avícolas, y en industrias de ganado bovino y porcino. ■

los antibióticos»). Por ejemplo, una cepa de *Escherichia coli* que fue congelada en nitrógeno líquido en 1946 contenía un plásmido con genes que confieren resistencia a tetraciclina y estreptomicina, aunque ninguno de estos antibióticos se utilizaría en medicina hasta varios años más tarde. Así mismo, se ha demostrado que existían cepas con genes plasmídicos R de resistencia a penicilinas semisintéticas, antes de que dichas penicilinas semisintéticas hubiesen sido sintetizadas. O quizás aún de mayor importancia ecológica sea el hecho de que se hayan detectado plásmidos R, que confieren resistencia a antibióticos, en algunas *Bacteria* Gram negativas no patógenas del suelo. En el suelo, los plásmidos de resistencia pueden conferir ventajas selectivas porque los principales organismos productores de antibióticos (*Streptomyces*, bacteria; *Penicillium*, hongo) también son organismos normales del suelo. Por tanto, parece que los plásmidos R no son un fenómeno reciente sino que existían en las poblaciones microbianas naturales antes de que se descubrieran los antibióticos y se utilizaran tanto en medicina como en agricultura. Posteriormente, el uso generalizado de los antibióticos en clínica y en agricultura creó las condiciones selectivas para la rápida diseminación de estos plásmidos R. Los plásmidos R son el resultado predecible de la selección natural. Esto limita de forma significativa la utilización a largo plazo de cualquier antibiótico como agente quimioterapéutico eficaz.

Diseminación de la resistencia a los antimicrobianos

La abusiva utilización inapropiada de los antimicrobianos está conduciendo al desarrollo rápido de resistencias específicas en microorganismos que producen enfermedades. El descubrimiento y uso clínico de muchos de los antibióticos conocidos ha sido paralelo a la emergencia de bacterias resistentes a su acción. Hay numerosos ejemplos de abuso de antibióticos y el concomitante desarrollo de resistencias. En la figura 20.25*a* se muestra una correlación entre el número de toneladas de antibióticos utilizados y el porcentaje de bacterias resistentes a cada antibiótico.

Los fármacos prescritos para el tratamiento de una infección particular han ido aumentando progresivamente, debido al aumento en la resistencia del microorganismo productor de la enfermedad. Un ejemplo clásico es el desarrollo de resistencia a la penicilina en *Neisseria gonorrhoeae*, la bacteria que causa la gonorrea (Figura 20.25*b*). La penicilina ya no es un antibiótico útil en el tratamiento de la gonorrea porque un gran número de aislamientos clínicos producen β-lactamasa y son resistentes. Prácticamente todas las cepas resistentes se desarrollaron desde 1980. El antibiótico de elección actual es la ceftriaxona, pero se recomiendan nuevas modalidades en el tratamiento casi cada año, para limitar los efectos de los genes de resistencia que emergen rápidamente (*véase* Sección 26.12).

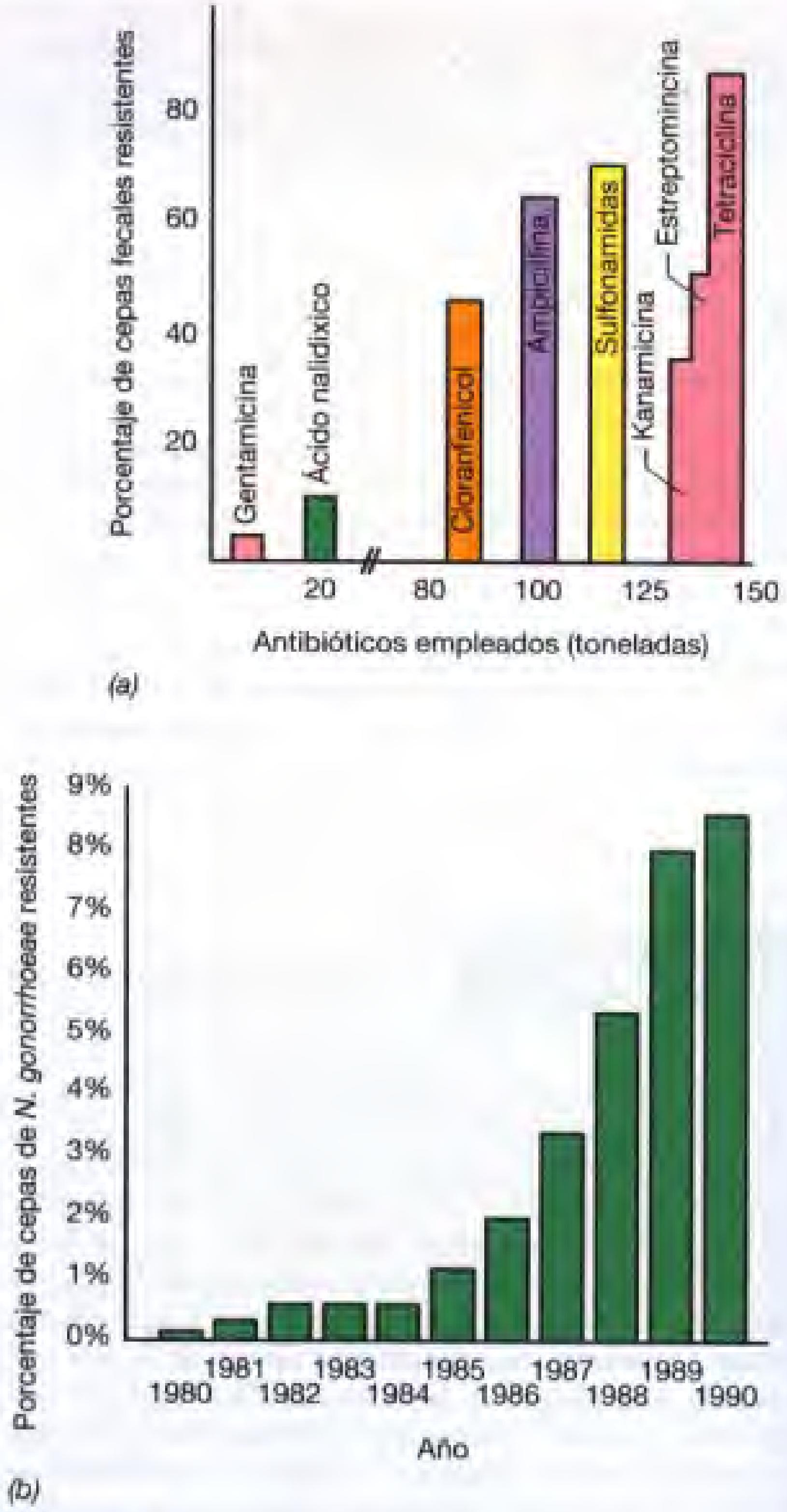


Figura 20.25 Emergencia de bacterias resistentes a drogas antimicrobianas. (a) Relación entre el uso de antibióticos y el porcentaje de bacterias resistentes a antibióticos aisladas de pacientes con diarrea. Los agentes que se han utilizado en mayores cantidades (lo que viene indicado por la cantidad producida comercialmente) son los que tienen mayor número de cepas resistentes. (b) Porcentaje de casos registrados causados por cepas resistentes. El número de casos con cepas resistentes en 1985 fue de 9000. Este número subió a 59 000 en 1990. Más del 95% de los casos de resistencia registrados eran debidos a cepas productoras de penicilinasa de *Neisseria gonorrhoeae*. Desde 1990 no se recomienda la penicilina para el tratamiento de la gonorrea debido a la emergente resistencia a ese antibiótico. (Fuente: Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia).

El seguimiento y control mundial sugieren que los antibióticos se usan en la práctica clínica con mucha mayor frecuencia de lo necesario. Los datos indican que el tratamiento con antibióticos está garantizado en el 20% de los individuos que acuden al médico por enfermedades infecciosas. A pesar de ello, los antibióticos se prescriben el 80% de los casos. Además, en el 50% de los casos, las dosis recomendadas o la duración de los tratamientos no son correctos. Esto se acompaña del incumplimiento de la pauta terapéutica por parte del paciente: muchos pacientes dejan de tomar la medicación, especialmente los antibióticos, en cuanto «se sienten mejor». Por ejemplo, la emergencia de tuberculosis resistente a isoniazida se correlaciona con la interrupción del tratamiento por parte del paciente, que deja de tomar la medicación durante seis a nueve meses, como se le había prescrito (*véase* Sección 26.5). Por ello, a menudo los patógenos están sometidos a dosis subletales de antibióticos por periodos cortos de tiempo, seleccionándose los organismos resistentes. En gran medida, y como consecuencia del inapropiado uso de los antibióticos y el incumplimiento de las pautas terapéuticas, casi todos los microorganismos patógenos han desarrollado resistencia a alguno de los agentes quimioterapéuticos, desde su uso generalizado en los años 1950 (Figura 20.26). La penicilina y las sulfamidas, los primeros quimioterápicos utilizados de forma general, ya no se emplean con tanta frecuencia hoy en día dado que muchos patógenos se han hecho resistentes a ellos. Incluso aquellos microorganismos que siguen siendo sensibles a penicilina, como *Streptococcus pyogenes* (bacteria causante de inflamación de garganta, escarlatina y fiebre reumática, *véase* Sección 26.2), necesitan una dosis significativamente superior que hace diez años, para que el tratamiento sea eficaz.

Otros usos indiscriminados de los antibióticos también contribuyen a la emergencia de cepas resistentes. Por ejemplo, los antibióticos se emplean en agricultura y ganadería, tanto como sustancias que estimulan el crecimiento en la alimentación animal como de profilácticos (para prevenir la aparición de enfermedades más que para el tratamiento de las existentes). Algunos de los últimos brotes de infecciones transmitidas por alimentos se han atribuido al uso de antibióticos en los piensos para animales. Así, si se saturan los diversos ambientes con antibióticos, la resistencia a los mismos se desarrollará rápidamente.

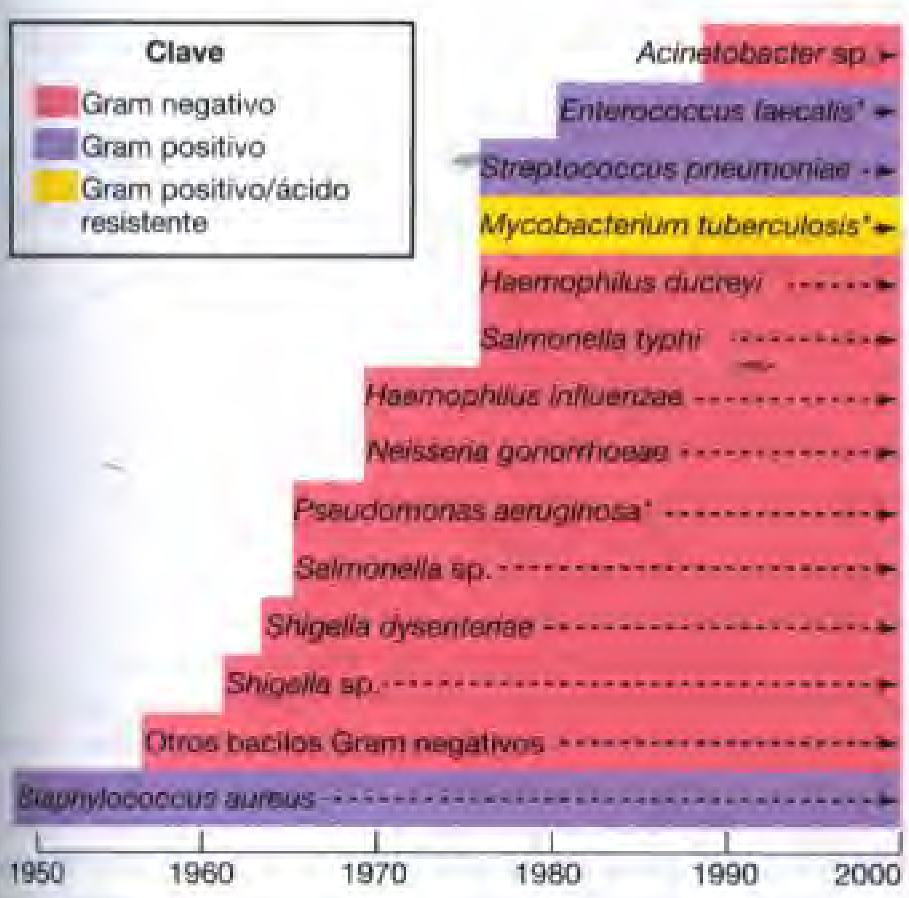


Figura 20.26 Aparición de resistencia a drogas antimicrobianas en algunos patógenos humanos. El símbolo * indica que algunas cepas multirresistentes de esos organismos pueden tratarse ahora con otras drogas antimicrobianas conocidas.

Por ejemplo, a pesar de que las fluoroquinolonas sólo se han utilizado masivamente durante 10 años, como anabolizantes y en la profilaxis de algunas enfermedades en agricultura, rápidamente emergieron cepas de *Campylobacter jejuni* resistentes a fluoroquinolonas, presumiblemente debido a la práctica de tratar a los pollos en las granjas avícolas con estos antibióticos para prevenir infecciones respiratorias. Por esta razón, tanto los criadores de pollos como los fabricantes de medicamentos han venido tomando iniciativas para controlar la utilización de fluoroquinolonas de segunda generación en agricultura y ganadería, y prevenir la rápida emergencia de resistencias. Esta resistencia puede minimizarse si los antimicrobianos sólo se utilizan en el tratamiento de las enfermedades y se administran en dosis suficientemente elevadas y durante bastante tiempo para que se reduzca la población microbiana antes de que aparezcan mutantes resistentes. Dicha resistencia también puede reducirse combinando dos quimioterápicos no relacionados, ya que si aparece una cepa mutante resistente a uno de los antibióticos es fácil que ésta siga siendo sensible al otro. No obstante, con el creciente predominio de los factores R que confieren resistencias múltiples a bacterias patógenas, la antibioticoterapia múltiple está dejando de aplicarse como estrategia clínicamente útil.

Algunos informes sugieren que si se suspende el empleo de un antibiótico determinado, la resistencia a dicho antibiótico desaparecerá con el tiempo. Estos datos indican que la resistencia es reversible y que la eficacia de algunos antibióticos puede restablecerse eliminando su uso durante algún tiempo, y controlando cuidadosamente su prudente utilización. Por último, como hemos comentado anteriormente, constantemente se están produciendo nuevos quimioterápicos mediante diversos métodos que permiten descubrir y diseñar nuevos medicamentos.

✓ 20.12 Revisión de conceptos

Un importante efecto secundario derivado de la utilización de agentes quimioterapéuticos es el desarrollo de resistencias por parte de los microorganismos afectados. En muchos casos, la resistencia es el resultado de la selección de genes de resistencia ya existentes, por el uso indiscriminado de antimicrobianos. Muchos antimicrobianos anteriormente útiles dejan de ser clínicamente utilizables debido a la aparición de resistencias: algunos microorganismos han desarrollado resistencia a los antimicrobianos conocidos, lo que hace temer el regreso a la era preantibiótica cuando las enfermedades infecciosas no podían tratarse.

- ✓ ¿Por qué aparece la resistencia a los antibióticos?
- ✓ ¿Qué medidas prácticas deberían tomarse para evitar o minimizar el desarrollo de resistencias a los antibióticos?

20.13 Búsqueda de nuevos antimicrobianos

Como ya se ha comentado, con el tiempo de exposición suficiente, la resistencia se desarrollará frente a todos los antimicrobianos conocidos. En consecuencia, el empleo adecuado de los antibióticos es absolutamente necesario para prolongar el tiempo de vida clínica de dichos medicamentos.

Sin embargo, la solución a largo plazo que resuelva la resistencia microbiana a estos compuestos es el desarrollo de nuevos antimicrobianos. Algunas estrategias permiten la identificación y producción de análogos útiles de los compuestos existentes, o el diseño y descubrimiento de nuevos compuestos antimicrobianos.

Nuevos análogos de los antimicrobianos existentes

La producción de nuevos análogos de los antimicrobianos existentes generalmente es sencillo y a menudo productivo, debido en gran parte a que los compuestos nuevos que mimetizan la estructura de los anteriores tienen un mecanismos de acción predecible. En muchos casos, algunos parámetros como la solubilidad y la afinidad pueden cambiarse introduciendo mínimas modificaciones en la estructura química de un compuesto, sin alterar las estructuras que son críticas para la acción del mismo. El nuevo compuesto puede ser más potente que el compuesto del que procede y, dado que la resistencia se basa en el reconocimiento de la estructura, el nuevo compuesto puede no ser reconocido por los factores de resistencia. Por ejemplo, en la Figura 20.22 se muestra la estructura básica de la tetraciclina y dos derivados biológicamente activos. Usando la tetraciclina como *compuesto inicial*, sistemáticamente se pueden realizar sustituciones químicas en los cuatro sitios R, generando una serie casi inagotable de análogos de la tetraciclina. Siguiendo esta estrategia básica, rutinariamente se sintetizan y comprueban nuevos antibióticos β-lactámicos (*véase* Sección 20.8), nuevos compuestos relacionados con la tetraciclina (*véase* Sección 20.9) y nuevos análogos de la vancomicina (Figura 20.12), algunos hasta cien veces más potentes que el compuesto inicial de partida.

La aplicación de métodos químicos automatizados para el descubrimiento de nuevos medicamentos ha incrementado drásticamente nuestra capacidad para generar nuevos compuestos potencialmente antimicrobianos. Los métodos automatizados, conocidos como *química combinatoria*, modifican sistemáticamente un producto antimicrobiano conocido generando un gran número de nuevos análogos. Por ejemplo, mediante los métodos combinatorios químicos automatizados, y empezando con la tetraciclina como compuesto inicial de partida (Figura 20.22), se pueden usar cinco reactivos diferentes para introducir sustituciones en los cuatro grupos R diferentes de la tetraciclina. Los sitios sustituidos darán 5 × 5 × 5 × 5 (cinco derivados de cada uno de los cuatro sitios), o 725 derivados diferentes de la tetraciclina con sólo seis reactivos diferentes, ¡y todo en unas pocas horas! La actividad biológica de estos compuestos se ensaya *in vitro* en diferentes microorganismos, también con técnicas automatizadas. La síntesis y los procesos de escrutinio y búsqueda automatizados disminuyen enormemente el tiempo necesario para encontrar nuevos medicamentos y aumenta el número de nuevos compuestos candidatos en más de diez veces cada año.

Según las estimaciones de la industria farmacéutica, deben examinarse unos 7 millones de compuestos candidatos para encontrar un único compuesto clínicamente útil. Como acabamos de comentar, este proceso empieza con la síntesis, el aislamiento y análisis de los compuestos candidatos. Los

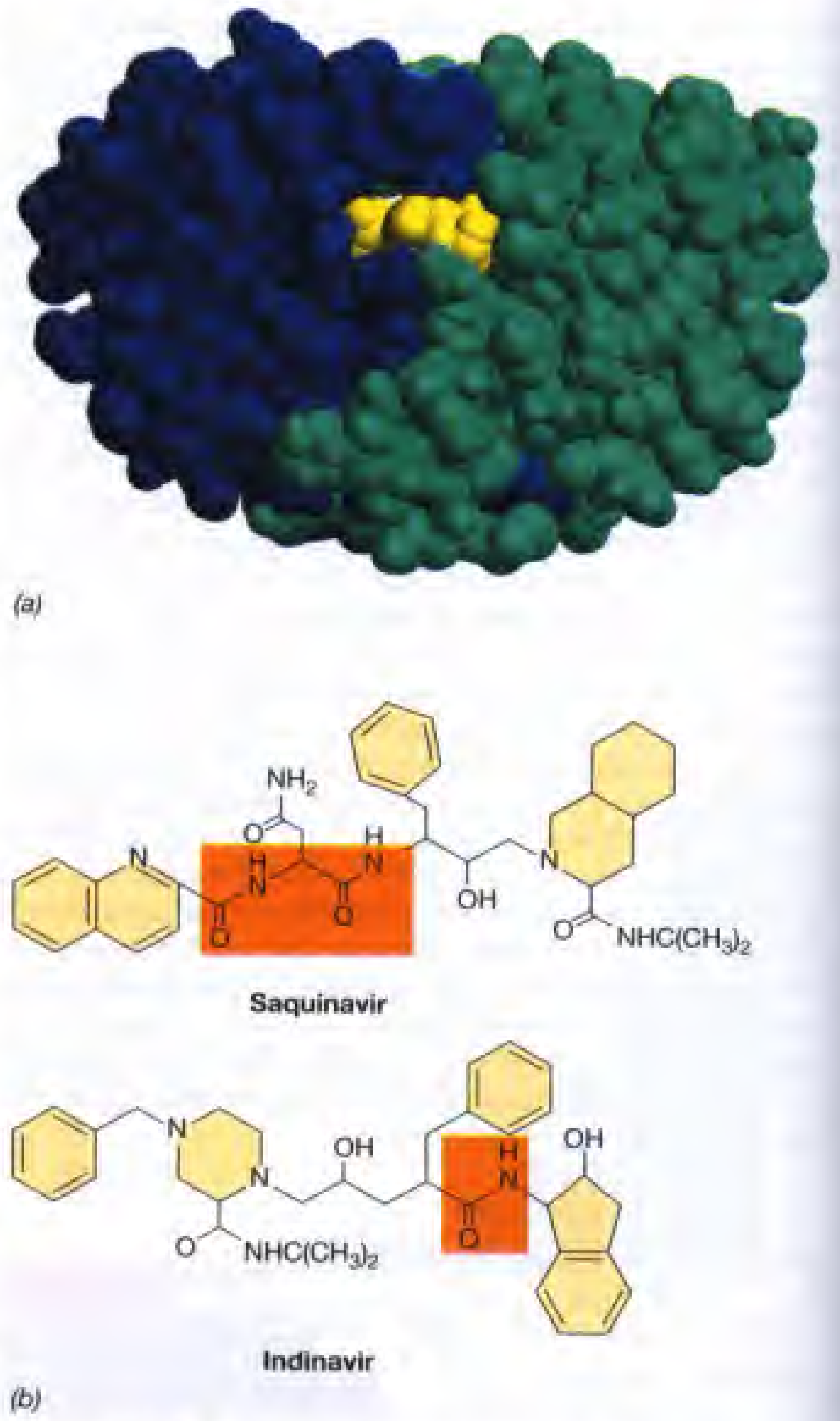


Figura 20.27 Drogas antivíricas generadas por computador. (a) El homodímero de la HIV proteasa. Las cadenas polipeptídicas individuales se representan en verde y azul. Un péptido (amarillo) está ligado por el sitio catalítico. Esta proteasa rompe una proteína precursora de HIV, un paso necesario en la maduración del virus (Sección 16.4). Si se bloquea el sitio de acción de la proteasa mediante el péptido mostrado, se inhibe el procesado precursor y la maduración de HIV. Esta estructura se ha deducido de la información existente en el Protein Data Bank. (b) Esas drogas anti-HIV son análogos de péptidos que fueron diseñados por ordenador para bloquear el sitio antivo de la HIV proteasa. Las áreas destacadas en color naranja muestran las regiones análogas a los enlaces peptídos. Si estos compuestos son ligados por la proteasa de HIV, se inhibe el procesado precursor y la maduración del virus. Estos compuestos representan una clase de drogas terapéuticas conocidas como inhibidores no-nucleosídicos de la transcriptasa inversa (sigla, del inglés, NNRTI). La concentración de esos compuestos en células infectadas por HIV, junto con su fuerte afinidad por la transcriptasa inversa de HIV los hace potentes inhibidores de los sitios activos de la transcriptasa e impide la replicación vírica. Esos inhibidores de la proteasa se están utilizando extensamente para tratar la infección por HIV (*véanse* Tabla 20.5 y Sección 26.14).

análisis consisten en los tests *in vitro* para la sensibilidad a antibióticos (*véase* Sección 20.4). En los compuestos que son activos en el laboratorio debe ensayarse su eficacia y toxicidad en animales y, por último, en ensayos clínicos en humanos. Los ensayos en animales pueden requerir varios años y múltiples pruebas para asegurar que el compuesto candidato sea eficaz y su uso no suponga ningún riesgo. Por las mismas razones, los ensayos clínicos suelen durar varios años hasta completar la serie de pruebas para cada compuesto. El descubrimiento y desarrollo de un nuevo medicamento normalmente tarda unos 10 a 25 años antes de que sea aprobado para su utilización clínica. Se estima que el costo del descubrimiento y desarrollo es de alrededor de 500 millones de dólares (EE.UU) para cada nuevo medicamento aprobado.

Diseño computerizado de medicamentos

La identificación de compuestos antimicrobianos realmente nuevos es mucho más difícil que de análogos de compuestos ya existentes, porque los nuevos antimicrobianos deben actuar en sitios únicos en las rutas metabólicas y biosintéticas, o tener una estructura diferente a la de los compuestos conocidos para evitar las resistencias existentes. Para encontrar estos compuestos nuevos, los candidatos han de aislarse de fuentes naturales y analizarse sistemáticamente para su actividad antimicrobiana. No obstante, los últimos avances en la tecnología computerizada de imágenes y estructuras posibilitan el diseño de un compuesto que interaccione con estructuras microbianas conocidas. El descubrimiento de medicamentos ahora puede empezar en el computador, donde nuevos compuestos pueden «crearse» rápidamente, y «ensayarse» para su unión y toxicidad en el ambiente computerizado, con un costo bajo (*véanse* Secciones 30.4 y 26.8). Uno de los últimos éxitos más importantes en el diseño de medicamentos dirigidos por computador, es el desarrollo del saquinavir, un inhibidor de la proteasa que se usa para disminuir la velocidad de multiplicación del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) en los individuos infectados (Figura 20.27). La proteasa del HIV corta una proteína precursora, codificada por el virus, que produce la nucleocápsida madura del virus y activa la transcriptasa reversa necesaria para su replicación (*véase* Sección 16.14). El saquinavir se diseñó por computador para fijarse al sitio activo de la proteasa del HIV, basándose en el modelo tridimensional del complejo proteasasustrato; es un análogo peptídico que desplaza la proteína precursora del HIV, inhibiendo la maduración del virus y disminuyendo su multiplicación en el hospedador humano. Otros compuestos inhibidores de la proteasa diseñados por computador, como el saquinavir, se usan como quimioterápicos en el tratamiento del SIDA (*véanse* Tabla 20.5, Figura 20.27 y Figura 26.38). Como se muestra en este ejemplo, el diseño por computador basado en en la modelización estructural y bioquímica es un método práctico para el diseño de antimicrobianos, así como rápido y barato.

✓ 20.13 Revisión de conceptos

Constantemente se están descubriendo y desarrollando nuevos antimicrobianos para vencer los microorganismos resistentes y tratar las enfermedades infecciosas. No obstante, su descubrimiento y desarrollo es largo y costoso. El diseño de medicamentos por computador es una herramienta importante y nueva para descubrir nuevos medicamentos.

- ✓ Los análogos de los compuestos existentes a menudo se desarrollan para utilizarse como antimicrobianos de nueva generación. Explique las ventajas y desventajas de esta estrategia para tratar enfermedades infecciosas.
- ✓ ¿Cómo el diseño de medicamentos por computador ahorra tiempo y dinero en la búsqueda de nuevos medicamentos?

Preguntas de repaso

1. ¿Por qué es importante el tiempo de reducción decimal (*D*) en la esterilización por calor? ¿Podría afectar a *D* la presencia de endosporas bacterianas?
2. Describa los efectos de la radiación ionizante letal a nivel molecular.
3. ¿Cuáles son las principales ventajas de la utilización de filtros de membrana en lugar de filtros de profundidad?
4. ¿Por qué los filtros Nuclepore son especialmente útiles para aislar muestras para microscopía?
5. Describa el procedimiento para obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) para un compuesto químico bactericida para *Escherichia coli*?
6. Diferencie entre el modo de acción de desinfectantes y antisépticos. ¿Por qué los desinfectantes habitualmente no pueden usarse en tejidos vivos?
7. Los análogos de los factores de crecimiento se diferencian de los antibióticos por un único criterio importante. Explíquelo.
8. La mayoría de los antibióticos son producidos sólo por algunos grupos de organismos. ¿Es cierta esta aseveración? ¿Qué grupos de organismos producen antibióticos?
9. Describa el mecanismo de acción característico de un antibiótico β-lactámico.
10. Diferencie entre el mecanismo de acción de al menos tres antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas.
11. ¿Por qué los antivíricos generalmente son tóxicos para el hospedador?
12. Defina las dianas de acción específicas que permiten la toxicidad selectiva de los quimioterápicos en hongos.
13. Señale los principales mecanismos responsables de la resistencia a los antibióticos.
14. ¿Cuál es el origen de los genes bacterianos de resistencia a los antibióticos?
15. Partiendo de un compuesto inicial, describa los métodos de *química combinatoria* usados en la producción de nuevos análogos de medicamentos.

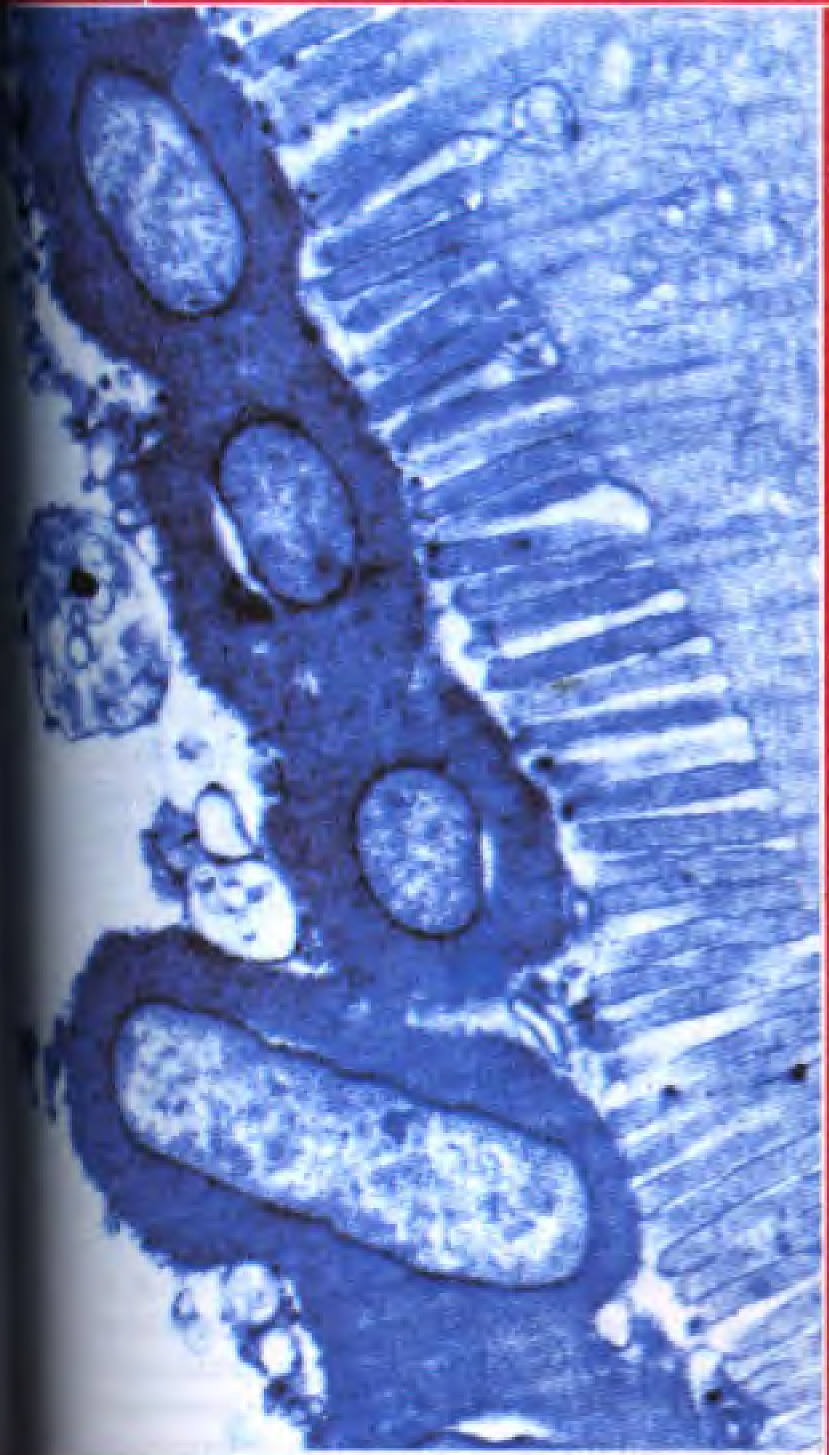
Ejercicios prácticos

1. Describa, mediante un gráfico, los resultados experimentales que esperaría para el tiempo de reducción decimal de un organismo muy sensible. ¿Podría verse afectado este gráfico si las células vegetativas fueran termosensibles pero el organismo formase endosporas termorresistentes?
2. ¿Cuáles son algunos de los inconvenientes potenciales del empleo de la radiación en la conservación de alimentos? ¿Cree que estas desventajas podrían suponer un peligro para la salud? ¿Por qué o por qué no? ¿Cómo podría distinguir entre alimentos dañados por la radiación y alimentos contaminados con la radiación?
3. La filtración es un método aceptable para la pasteurización de algunos líquidos. Diseñe un sistema de filtración para pasteurizar una solución termosensible. ¿Por qué se prefiere un sistema de filtración a un sistema de pasteurización por calor?
4. Diseñe un experimento que le permita distinguir entre un agente microbicida y un microbiostático. ¿Puede utilizar el test de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en sus experimentos? Explíquelo.
5. ¿Qué tests realizaría para decidir si un agente químico podría utilizarse como antiséptico?, ¿y como desinfectante? Algunos compuestos químicos pueden usarse con ambas finalidades. Describa las propiedades de dichos compuestos y dé algún ejemplo.
6. Aunque los análogos de los factores de crecimiento pueden inhibir el metabolismo microbiano, sólo algunos de estos agentes son útiles en la práctica. Muchos agentes potenciales, y algunos que se utilizan ampliamente, como la azidotimidimina (*véase* Tabla 20.5), tienen toxicidad selectiva para la célula hospedadora. Describa un análogo de un factor de crecimiento que sea eficaz y tenga baja toxicidad selectiva para las células del hospedador. ¿Por qué es baja la toxicidad para el agente que ha escogido? También describa un análogo de un factor de crecimiento que sea eficaz en una enfermedad infecciosa pero muestre toxicidad selectiva para las células del hospedador. ¿Por qué podría usarse un agente tóxico como el AZT en ciertas situaciones para tratar enfermedades infecciosas? ¿Qué precauciones tomaría a fin de limitar los efectos tóxicos de dicho compuesto, maximizando la actividad terapéutica? Explique su respuesta.
7. Menos del 1% de todos los antibióticos conocidos tienen un valor práctico tanto en la investigación como en la clínica. Indique cuál es la razón. ¿Piensa que es importante expandir y continuar la búsqueda de nuevos antibióticos? ¿Qué alternativas al tratamiento con antibióticos están, o podrían estar, disponibles para el tratamiento de enfermedades microbianas en el hombre?
8. Diseñe un experimento para investigar microorganismos que produzcan nuevos antibióticos. ¿Qué grupo o grupos de microorganismos escogería? ¿Dónde podría encontrar y aislar estos organismos en un ambiente natural? ¿Qué ventaja supondría la producción de un antibiótico para estos organismos en la naturaleza? ¿Qué métodos *in vitro* emplearía para ensayar la eficacia de sus potenciales antibióticos nuevos? (quizás desee revisar la información de las Secciones 12.24 y 30.5 antes de contestar).
9. Aunque los antibióticos β-lactámicos muestren una toxicidad selectiva para *Bacteria*, muchos grupos de *Bacteria* son resistentes de forma innata a sus efectos. Sin mencionar los genes de resistencia bacterianos, indique por qué las *Bacteria* Gram negativas son resistentes a la acción de la mayoría, si no de todos, los antibióticos β-lactámicos. Explique, además, por qué algunos antibióticos β-lactámicos son útiles frente a estos microorganismos.
10. ¿Qué ventajas potenciales podrían tener los aminoglicósidos, los macrólidos y las tetraciclinas sobre la penicilina G en quimioterapia? Explíquelo.
11. Haga una lista de las características de un antivírico ideal, especialmente con respecto a su toxicidad selectiva. ¿Existen dichos compuestos? ¿Qué factores podrían limitar la utilización de dicho medicamento?
12. Como los virus, los hongos tienen algunos problemas desde el punto de vista quimioterapéutico. Explique los problemas inherentes en la quimioterapia de ambos grupos de microorganismos y exponga si está de acuerdo o en desacuerdo con la anterior aseveración. Dé ejemplos específicos y sugiera al menos un grupo de agentes quimioterapéuticos que pudieran actuar frente a ambos tipos de agentes infecciosos.
13. Explique las bases genéticas de la resistencia adquirida a los antibióticos β-lactámicos en *Staphylococcus aureus*. Diseñe una serie de experimentos para revertir la resistencia de los antibióticos β-lactámicos. ¿Cree que esto es posible? ¿Podría aplicarse su experimento «en el campo» («en el ambiente natural») para evitar la selección de microorganismos resistentes a antibióticos? Explíquelo.
14. Diseñe un compuesto que inhiba la actividad de la proteasa del HIV basado en la estructura que se muestra en la Figura 20.27. Utilice un mecanismo *diferente* al de la inhibición competitiva en el sitio activo de la enzima.

Los microorganismos son ubicuos y son parte constante de la experiencia humana. Nosotros estamos constantemente expuestos a los microorganismos y muchos han establecido su residencia en nuestros cuerpos. Muchos hacen poco o ningún daño, pero algunos son beneficiosos. Un número pequeño de microorganismos causan daño significativo a los humanos, resultando en la posible destrucción de los tejidos y la pérdida de función. En la imagen mostrada aquí, se muestra un microorganismo que normalmente se encuentra en la cavidad bucal, *Streptococcus mutans*, que ha colonizado los dientes y procede a su destrucción. El resultado final es la caries dental es muy común en las enferemedades bacterianas.

21

RELACIONES HOSPEDADOR-PARÁSITO EN HUMANOS



I INTERACCIONES MICROBIANAS BENEFICIOSAS CON HUMANOS 720
21.1 Generalidades de las interacciones microbianas beneficiosas con humanos 720
21.2 Biota normal (microbiota) de la piel 722
21.3 Biota normal (microbiota) de la cavidad bucal 723
21.4 Biota normal (microbiota) del tracto gastrointestinal 725
21.5 Biota normal (microbiota) de otras regiones del cuerpo 727

II INTERACCIONES DAÑIÑAS DE MICROORGANISMOS CON HUMANOS 729
21.6 Entrada del patógeno en el hospedador 729
21.7 Colonización y crecimiento 731
21.8 Virulencia 732

III FACTORES DE VIRULENCIA Y TOXINAS 734
21.9 Factores de virulencia 735
21.10 Exotoxinas 735
21.11 Enterotoxinas 738
21.12 Endotoxinas 740

IV DEFENSAS INESPECÍFICAS DEL HOSPEDADOR 741
21.13 Resitencia no específica a la infección 741
21.14 Inflamación y fiebre 744

Glosario

Atenuación disminución o pérdida de la virulencia

Bacteriemia presencia de microorganismos en sangre

Biota normal (microbiota) microorganismos que están presentes generalmente en los tejidos sanos

Capa Viscosa (*Slime layer*) fibras difusas que rodean la célula y que se extienden fuera de ella.

Cápsula Bien definida y densa capa de polisacárido o proteína que rodea a la célula

Caries dental deterioro dental como resultado de una infección bacteriana

Colonización multiplicación de un patógeno tras alcanzar los tejidos del hospedador

Endotoxina fracción del lipopolisacárido de la pared celular de algunas bacterias Gram negativas, que al solubilizarse actúa como una toxina

Enfermedad daño que se produce en un hospedador y que afecta a su capacidad funcional

Enterotoxina proteína liberada por un organismo mientras se multiplica (*véase* exotoxina) y que actúa sobre el intestino delgado

Exotoxina proteína liberada por un microorganismo durante el crecimiento y que posee efectos tóxicos sobre las células del hospedador

Fiebre aumento en la temperatura corporal por encima de lo normal

Glicocálix polisacáridos bacterianos que se extienden fuera de la célula

Hospedador organismo que alberga a un parásito

Infección multiplicación de los microorganismos en el hospedador

Inflamación respuesta del hospedador frente a una lesión o infección, que se caracteriza por eritema, hinchazón, calor y dolor

Invasividad capacidad de un patógeno para introducirse en el hospedador y diseminarse

Leucocitos células nucleadas que se hallan en la sangre (células blancas de la sangre)

Membranas mucosas capas de células epiteliales que interactúan con el ambiente exterior

Parásito organismo capaz de multiplicarse en un hospedador y producirle daño

Patogenicidad capacidad de un parásito para causar daño en un hospedador

Patógeno un microrganismo parasito que causa daño al hospedador

Placa dental conjunto de células bacterianas incluidas en una matriz de polímeros extracelulares y productos salivares, presentes en los dientes

Toxigenicidad patogenicidad causada por toxinas producidas por un patógeno

Tracto respiratorio inferior tráquea, bronquios y pulmones

Tracto respiratorio superior nasofaringe, cavidad oral y garganta

Virulencia grado de patogenicidad que es capaz de producir un determinado patógeno

En este capítulo empezamos a revisar la interacción de los microorganismos con los humanos. Los microorganismos normalmente crecen en el cuerpo humano en grandes cantidades. El tubo digestivo humano ha sido comparado frecuentemente con un frasco de cultivo, ya que las membranas mucosas que tapizan la boca, el intestino y los aparatos excretor y reproductor tienen una población normal de microbios que son beneficiosos y que permiten conservar sano el cuerpo. Sin embargo, un grupo pequeño de microorganismos utilizan mecanismos directos e indirectos para invadir el cuerpo humano para producir infección, enfermedad y causar daño al hospedador. Por ejemplo, las toxinas producen mucho daño al hospedador. No obstante, los humanos desarrollamos medidas efectivas para suprimir o destruir la mayoría de los microbios invasores; diversos procesos inespecíficos, físicos, anatómicos y bioquímicos, hacen que las infecciones microbianas sean relativamente poco frecuentes en la vida de un individuo.

I INTERACCIONES MICROBIANAS BENEFICIOSAS CON HUMANOS

Los microorganismos interaccionan con los humanos en una gran variedad de formas, a veces beneficiosas y a veces perjudiciales. Aquí examinamos los microorganismos que normalmente se asocian a un humano adulto con buena salud.

21.1 Generalidades de las interacciones microbianas beneficiosas con humanos

El hospedador está en continuo contacto con los microorganismos. En la vida diaria, los humanos se exponen a los microorganismos, como por ejemplo en la respiración, millones de células se encuentran en el ambiente. Miles de millones de microorganismos y cientos de especies constituyen en conjunto la **biota normal (microbiota)** y son especies que han desarrollado una relación íntima con determinados tejidos del hospedador. La mayoría, pero no todos, son benignos.

Patógenos

Un **parásito** es un organismo que vive sobre o en un segundo organismo denominado **hospedador** y que le causa daño. Dichos organismos dañinos se llaman **patógenos**. El resultado de la relación hospedador-parásito depende de la *patogenicidad* del parásito, esto es, de la capacidad del parásito para causar daño al hospedador y de la *resistencia* o *susceptibilidad* del hospedador al parásito.

La patogenicidad depende del patógeno individual. El término *virulencia* es cuantitativo, se utiliza para señalar el grado de patogenicidad del parásito. Comúnmente se expresa como la dosis o el número de células que desencadenarán una respuesta patológica en un periodo determinado de tiempo. Sin embargo, ni la virulencia del parásito ni la resistencia del hospedador son factores constantes: cada uno varía bajo la influencia de factores externos o como consecuencia de la propia relación hospedador-parásito.

Infección y enfermedad

El término **infección** se refiere a cualquier situación en la que un microorganismo se está desarrollando y estableciendo en un hospedador, causando o no en él un daño. Cuando se establece la **enfermedad**, el hospedador se encuentra lesionado de alguna manera. *Infección no es sinónimo de enfermedad* porque la infección no conduce siempre al daño en el hospedador. Por lo tanto la biota normal (microbiota) puede causar infecciones microbianas. La microbiota causa infecciones en pacientes comprometidos, como ocurre con el SIDA y en los pacientes con cáncer (*véase* Sección 26.14).

Interacciones microbianas con el hospedador

Los hospedadores animales proporcionan entornos favorables para el crecimiento de muchos microorganismos. Los animales son ricos en nutrientes orgánicos y factores de crecimiento requeridos por los quimioorganotrofos, suministrando condiciones de pH y presión osmótica relativamente constantes, y los animales de sangre caliente mantienen constante temperaturas elevadas. Sin embargo, no debería considerarse el hospedador como un entorno microbiano uniforme. Cada región u órgano difiere química y físicamente de las otras zonas y, por tanto, proporciona un entorno selectivo donde se favorece a ciertos microorganismos frente a otros. La piel, el tracto respiratorio, el tracto gastrointestinal, etc., proporcionan una amplia variedad de condiciones químicas y físicas en las cuales diferentes microorganismos pueden crecer selectivamente. Por ejemplo, la relativa sequedad de la piel favorece el crecimiento de bacterias Gram positivas, como por ejemplo *Staphylococcus aureus* (*véase* Sección 26.9); los pulmones, como están muy oxigenados, favorecen el crecimineto de *Mycobacterium tuberculosis* (*véase* Sección 26.5); en el ambiente anaerobio del intestino se favorece el crecimiento de obligados anaerobios, como por ejemplo el género *Clostridium* (*véase* Sección 12.21) Los animales poseen también distintos mecanismos de defensa que actúan de forma conjunta para prevenir o inhibir la invasión y crecimiento microbianos. Los microorganismos que a la postre colonizan al hospedador con éxito son aquellos que han desarrollado vías para escapar a estos mecanismos de defensa.

Las infecciones comienzan frecuentemente en los lugares del hospedador denominados *membranas mucosas*. Las membranas mucosas se localizan en diferentes partes del cuerpo incluyendo la boca, faringe, esófago y en los tractos urinario, respiratorio y gastrointestinal. Las membranas mucosas constan de una o múltiples capas de *células epiteliales*, células firmemente empaquetadas que están en contacto directo con el ambiente exterior. Generalmente, las membranas mucosas están revestidas de una capa protectora de moco, fundamentalmente glicoproteínas, que sirven para proteger a las células epiteliales. Cuando las bacterias entran en contacto con los tejidos del hospedador a nivel de las membranas mucosas, pueden asociarse débil o estrechamente. Si se asocian a la superficie mucosa de una manera laxa, por lo común son arrastradas en virtud de procesos físicos aunque también pueden fijarse específicamente a la superficie epitelial como resultado de un reconocimiento específico célula-célula entre el patógeno y el hospedador. A partir de aquí puede producirse una infección tisular. Cuando esto ocurre, se rompe la barrera mucosa permitiendo que el patógeno invada los tejidos más profundos (Figura 21.1).

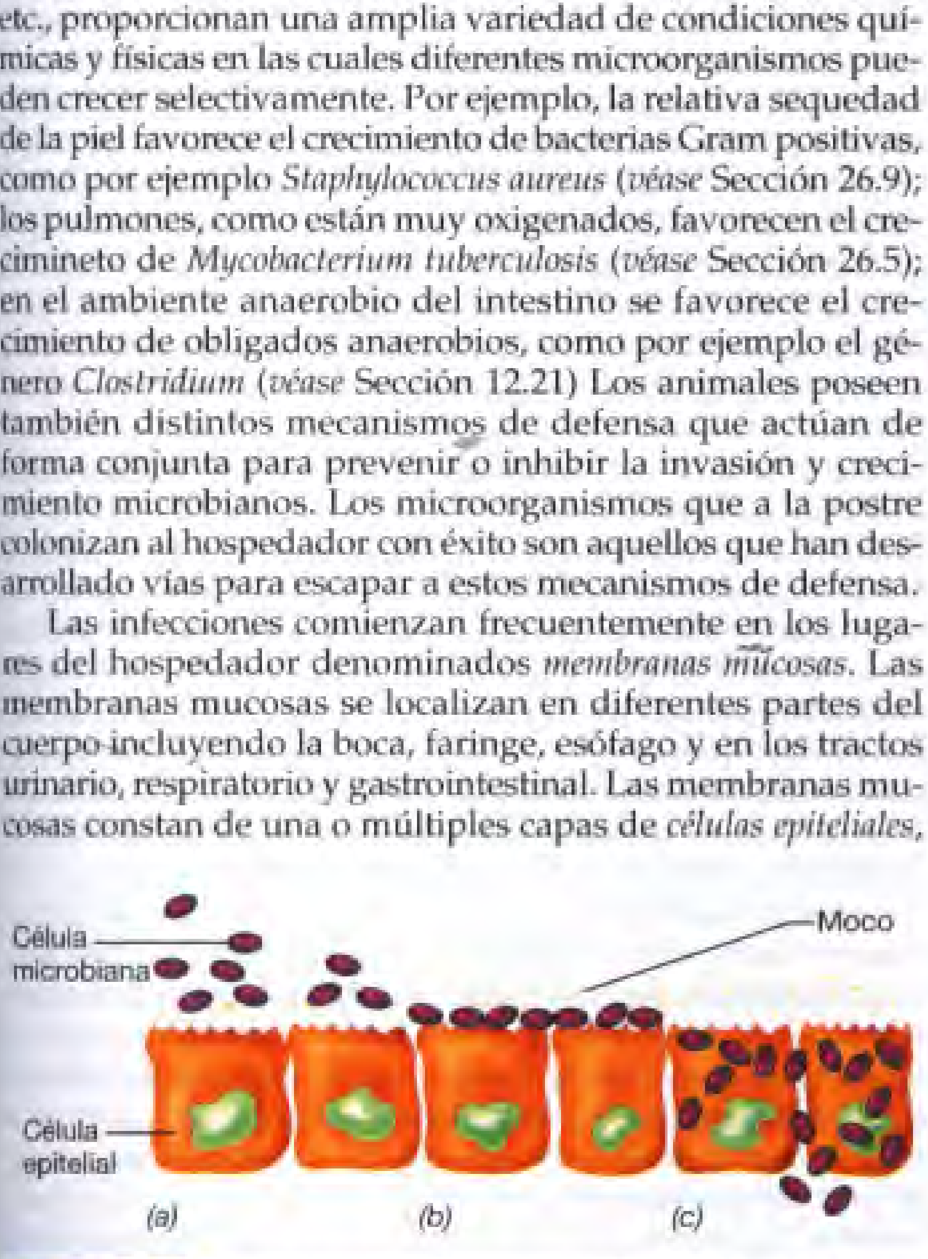


Figura 21.1 Interacciones bacterianas con las membranas mucosas. (a) Asociación débil. (b) Adhesión. (c) Invasión de las células de la submucosa.

Los microorganismos se encuentran casi siempre en aquellas zonas del cuerpo expuestas al ambiente como la piel, la cavidad oral, el tracto respiratorio, el tracto intestinal y el tracto genitourinario. Normalmente, no se hallan presentes en los órganos internos, la sangre y los sistemas linfáticos del cuerpo; cuando aparecen en cantidades significativas en estas últimas zonas, suelen indicar un estado de enfermedad.

La Tabla 21.1 muestra algunos de los principales tipos de microorganismos habitualmente asociados a las superficies corporales. Como veremos, la superficie del cuerpo más visible, la piel (2 m^2), posee un determinado número de habitantes. Sin embargo, las superficies mucosas tienen incluso más variedades de microorganismos asociados. Esto se debe, en parte, al entorno protegido, húmedo y acogedor de distintas superficies mucosas y también a la inmensa área de la superficie global de la mucosa (400 m^2). Por ejemplo, la función de un órgano como el intestino delgado requiere de una

TABLA 21.1 Microorganismos representativos en la biota normal (microbiota) del hombre

Lugar anatómico	Organismo[a]
Piel	*Staphylococcus, Corynebacterium, Acinetobacter, Pityrosporum* (levadura), *Propionibacterium, Micrococcus*
Boca	*Streptococcus, Lactobacillus, Fusobacterium, Veillonella, Corynebacterium, Neisseria, Actinomyces*
Tracto respiratorio	*Streptococcus, Staphylococcus, Corynebacterium, Neisseria*
Tracto gastrointestinal	*Lactobacillus, Streptococcus, Bacteroides, Bifidobacterium, Eubacterium, Peptococcus, Peptostreptococcus, Ruminococcus, Clostridium, Escherichia, Klebsiella, Proteus, Enterococcus, Staphylococcus*
Tracto urogenital	*Escherichia, Klebsiella, Proteus, Neisseria, Lactobacillus* (vagina de mujeres maduras), *Corynebacterium, Staphylococcus, Candida, Prevotella, Clostridium, Peptostreptococcus*

[a] Muchos de los géneros indicados contienen también especies patógenas para el hombre en circustancias determinadas. Esta lista no pretende ser exhaustiva y no todos los microorganismos se encuentran en todos los individuos.

gran área de superficie especializada para el transporte de nutrientes, y esta superficie sirve igualmente como un lugar para el crecimiento microbiano. Expondremos ahora con mayor detalle estas interacciones microbianas normales.

✓ 21.1 Revisión de conceptos

Los cuerpos de los animales favorecen el crecimiento de muchos microorganismos, pero muchos de los cuales no causan ningún daño. Los microorganismos que se desarrollan en el cuerpo y causan un daño se denominan *patógenos*. La infección es el proceso por el que un parásito llega a colonizar y desarrollarse en la superficie del hospedador, habitualmente en las membranas mucosas, y causar infección y enfermedad. La posibilidad de causar una infección está influenciada por una compleja red de interacciones del parásito y del hospedador. La mayoría de los patógenos son eliminados por los mecanismos de defensa del hospedador.

- ✓ Distinga entre *infección* y *enfermedad*.
- ✓ ¿Por qué determinadas áreas del cuerpo son más adecuadas que otras para el crecimiento microbiano?

21.2 Biota normal (microbiota) de la piel

Un hombre adulto tiene en promedio aproximadamente 2 m^2 de superficie de piel que puede variar enormemente en cuanto a composición química y humedad. La Figura 21.2 muestra la anatomía de la piel y las zonas en las que viven las bacterias. La superficie cutánea (epidermis) no es un lugar favorable para el crecimiento microbiano puesto que se halla sometida a una desecación periódica.

La mayoría de los microorganismos de la piel se asocia directa o indirectamente con las glándulas sudoríparas. Las *glándulas apocrinas* se hallan más restringidas en cuanto a su distribución, estando confinadas principalmente a las regiones axilares y genitales, pezones y ombligo. Están inactivas en la infancia y sólo llegan a ser plenamente funcionales en la pubertad. Las poblaciones bacterianas son relativamente elevadas en estas localizaciones calientes y húmedas de la superficie cutánea, a diferencia de lo que ocurre en la superficie cutánea lisa. El *olor axilar* se desarrolla como resultado de la actividad bacteriana sobre las secreciones apocrinas; la secreción apocrina recolectada asépticamente es inodora si bien termina por oler al inocularla con bacterias. Todos los folículos pilosos se asocian con la *glándula sebácea* que segrega un fluido lubricante. Los folículos pilosos proporcionan un hábitat atractivo para los microorganismos; una variedad de bacterias aerobias y anaerobias y hongos habitan estas regiones, la mayor parte en el área justo por debajo de la superficie cutánea. Las secreciones de las glándulas de la piel son ricas en nutrientes microbianos. Urea, aminoácidos, sales, ácido láctico y lípidos se hallan en considerables cantidades. El pH de las secreciones humanas es casi siempre ácido, estando el rango de pH normal entre 4 y 6.

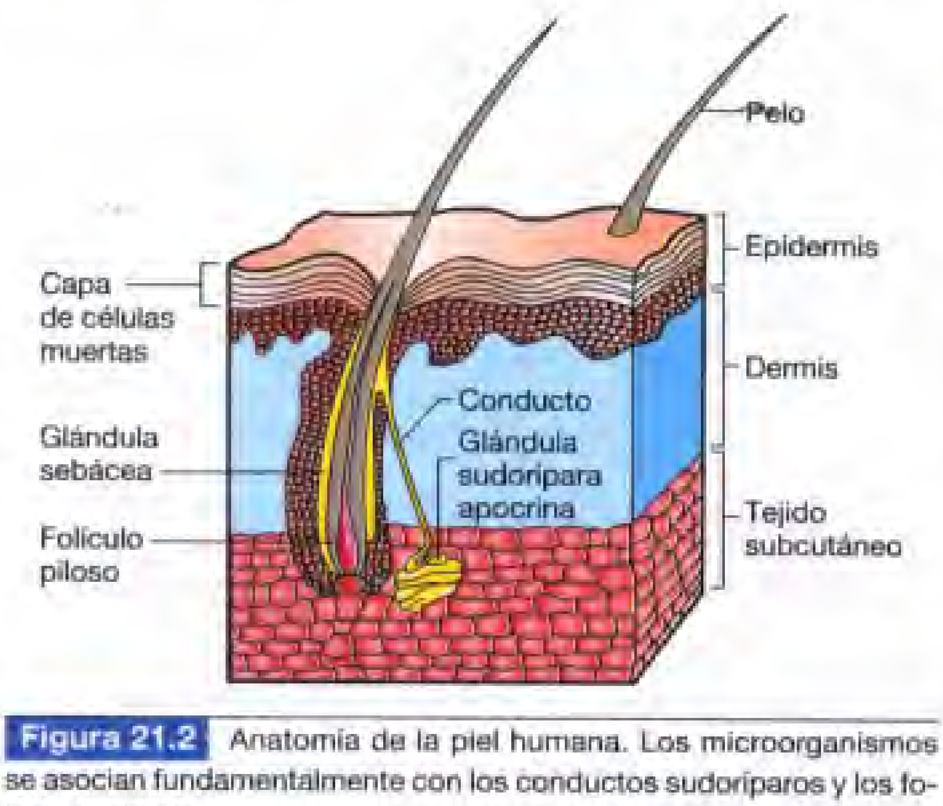


Figura 21.2 Anatomía de la piel humana. Los microorganismos se asocian fundamentalmente con los conductos sudoríparos y los folículos pilosos.

Los microorganismos de la biota normal (microbiota) de la piel son *transeúntes* o *residentes*. La piel como órgano externo está siendo constantemente inoculada con transeúntes, virtualmente todos los que son capaces de multiplicarse y generalmente morir. Los organismos residentes pueden multiplicarse en la piel y no simplemente sobrevivir. La biota normal (microbiota) de la piel consta primariamente de bacterias Gram positivas restringidas a unos pocos grupos (Tabla 21.1). Éstas incluyen distintas especies de *Staphylococcus* y varias corinebacterias aerobias y anaerobias. De éstas, el *Propionibacterium acnes* es habitualmente un residente inofensivo aunque puede desencadenar o contribuir al cuadro conocido como *acné*. Las bacterias Gram negativas son casi siempre constituyentes menores de la biota normal (microbiota), incluso aunque dichos organismos intestinales como *Escherichia coli* estén inoculándose constantemente en la superficie de la piel por contaminación fecal. *Acinetobacter* es una excepción y es una de las pocas bacterias Gram negativas que ordinariamente se encuentran en la piel. Se cree que la falta de colonización de bacterias Gram negativas en la piel se debe a su incapacidad para competir con los organismos Gram positivos que están mejor adaptados a las condiciones de sequedad de la piel; si éstos se eliminaran mediante tratamiento antibiótico, las bacterias Gram negativas podrían desarrollarse. En la superficie cutánea son raras las levaduras y también en las membranas mucosas. Sin embargo, la ausencia de resistencia en el hospedador (síndrome de inmunodeficiencia adquirida, SIDA) (*véase* Sección 26.14) o la ausencia de microbiota, por ejemplo los hongos como *Candida* spp. pueden crecer y causar serias infecciones en la superficie de la piel. En la superficie cutánea son raras las levaduras salvo la levadura lipofílica *Pityrosporum ovalis* que se encuentra ocasionalmente en el cuero cabelludo.

Aunque la microbiota residente permanece más o menos constante, varios factores pueden afectar a la naturaleza y la extensión de la biota normal (microbiota): (1) el clima puede originar un incremento en la temperatura y la humedad que aumenten la densidad de la microbiota cutánea; (2) la edad también influye y los chicos jóvenes poseen una microbiota más variada y portan más bacterias Gram negativas y más patógenos potenciales que los adultos, y (3) los hábitos higiénicos personales influyen sobre la microbiota residente, y los individuos poco aseados, por lo común, presentan en la piel mayores densidades de población microbiana. Los organismos que no pueden sobrevivir en la piel generalmente mueren, ya sea a consecuencia de la escasa humedad o del bajo pH (por el contenido ácido orgánico).

✓ 21.2 Revisión de conceptos

La piel es un entorno seco y ácido que no contribuye al crecimiento de la mayor parte de los microorganismos. Sin embargo, las áreas húmedas, especialmente alrededor de las glándulas sudoríparas, son colonizadas por bacterias Gram positivas y otros miembros de la biota normal (microbiota) de la piel.

- ✓ ¿Qué extensión tiene la superficie de la piel?
- ✓ Describa las propiedades de los microorganismos que crecen bien en la piel.

21.3 Biota normal (microbiota) de la cavidad bucal

La cavidad bucal es uno de los hábitat microbianos más heterogéneos y complejos del cuerpo. Esta cavidad incluye los dientes, la lengua y el espacio central. Si bien la saliva es la fuente más impregnada de nutrientes microbianos en la cavidad bucal, no es un medio de cultivo microbiano especialmente bueno. Se han identificado en la saliva numerosas sustancias antibacterianas de las que la mayoría son los enzimas *lisozima* y *lactoperoxidasa*. La lisozima es una enzima que escinde los enlaces glicosídicos del péptidoglicano (mucopéptido) de la pared celular bacteriana, produciendo el debilitamiento de la pared y la lisis celular (*véase* Sección 4.8). La lactoperoxidasa, una enzima presente en la leche y la saliva, destruye las bacterias mediante una reacción que involucra a los iones cloruro y al peróxido de hidrógeno (agua oxigenada), y en la que probablemente se genera oxígeno molecular (*véanse* Secciones 6.13 y 22.2). A pesar de la actividad de las sustancias antibacterianas, la presencia de partículas alimenticias y restos epiteliales convierten la cavidad oral en un hábitat microbiano muy favorable.

Los dientes y la placa dental

El diente está compuesto de una matriz mineral de cristales de fosfato cálcico (esmalte), dentro de la cual se encuentra el tejido vivo del diente (dentina y pulpa) (Figura 21.3). El diente influye en la naturaleza de la biota (microbiota) microbiana. Durante el primer año de vida (cuando no hay dientes) en la boca predominan las bacterias anaerobias aerotolerantes así como los estreptococos y lactobacilos, si bien otras bacterias, incluyendo algunas aerobias, aparecen en un número reducido. Cuando aparecen los dientes hay un cambio marcado en el equilibrio de la microbiota hacia los anaerobios, desarrollándose un tipo de bacterias adaptadas específicamente al crecimiento sobre superficies de los dientes y sobre la hendidura gingival.

La colonización bacteriana de las superficies lisas de los dientes se produce como consecuencia de un anclaje firme de células bacterianas individuales, seguido de un crecimiento en forma de microcolonias. A partir de una superficie dentaria recién limpia, se produce la formación de una fina película orgánica de varias micras de espesor como resultado de la fijación de glicoproteínas ácidas de la saliva. Esta película proporciona un sitio de anclaje más firme para la colonización de microcolonias bacterianas (Figura 21.4). La colonización de esta película glicoproteica es muy específica y sólo implica a unas cuantas especies de *Streptococcus* (primariamente *S. sanguis*, *S. sobrinus*, *S. mutans* y *S. mitis*). Como consecuencia del intenso crecimiento de estos organismos, se forma una zona bacteriana espesa denominada **placa dental** (Figuras 21.5 y 21.6). Si la placa sigue formándose, comienzan a desarrollarse bacterias filamentosas, generalmente especies de *Fusobacterium*. Las bacterias filamentosas se hallan embebidas en la matriz formada por estreptococos que se extiende perpendicular a la superficie dentaria, constituyendo una capa bacteriana más gruesa. Además de los estreptococos y en asociación con las bacterias filamentosas, están las espiroquetas como las especies de *Borrelia* (*véase* Sección 12.33), bacilos Gram positivos y cocos Gram negativos. En una placa gruesa pueden predominar los organismos filamentosos, así como las especies anaerobias de *Actinomyces*.

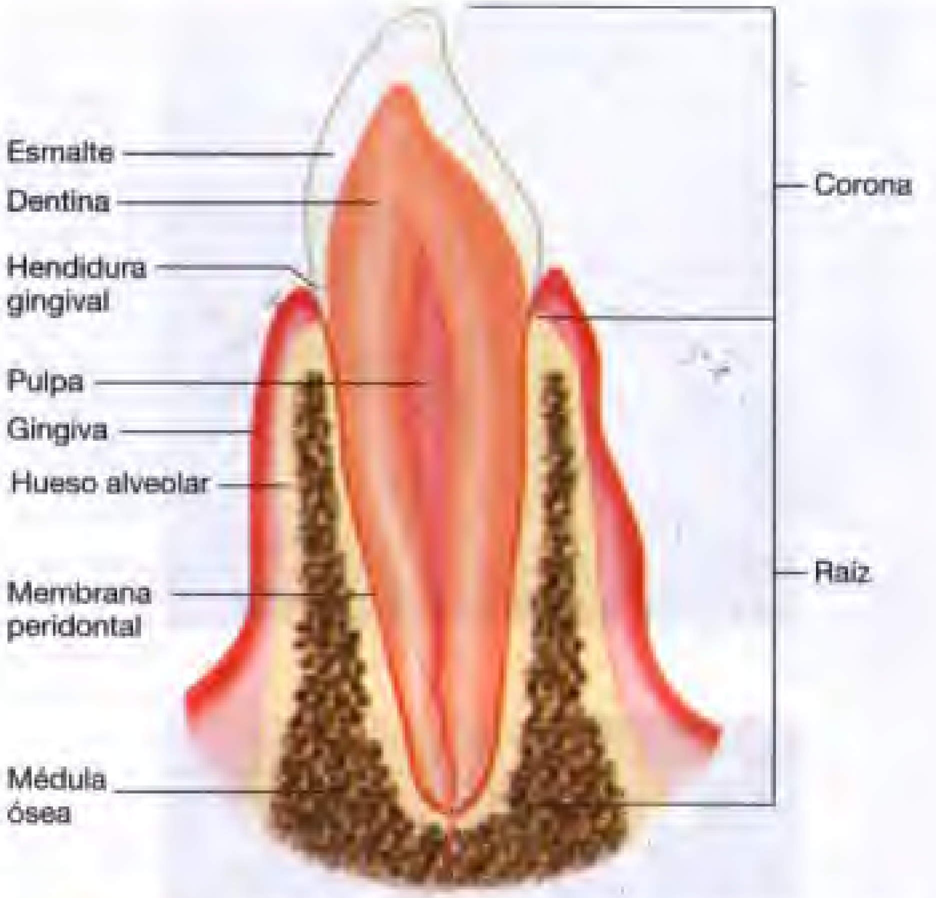


Figura 21.3 Sección de un diente mostrando los tejidos circundantes que fijan el diente a la encía.

Podría sorprender la naturaleza anaerobia de la biota (microbiota) teniendo en cuenta que la boca posee una buena accesibilidad para el oxígeno. Es probable que la anoxia sea el resultado de la acción de bacterias facultativas que se desarrollan en condiciones aerobias sobre los materiales orgánicos de los dientes, puesto que la densa matriz de la placa disminuye la difusión del oxígeno en la superficie del diente. Las poblaciones microbianas de la placa dental viven en un microambiente que ellas mismas fabrican en parte y también luchando contra las grandes variaciones en el microambiente de la cavidad bucal.

Caries dental

El resultado final del aumento de la placa dental y la formación de productos ácidos es la **caries dental** (deterioro dental). De ahí que el deterioro de los dientes sea una enfermedad infecciosa causada por microorganismos. Las su-

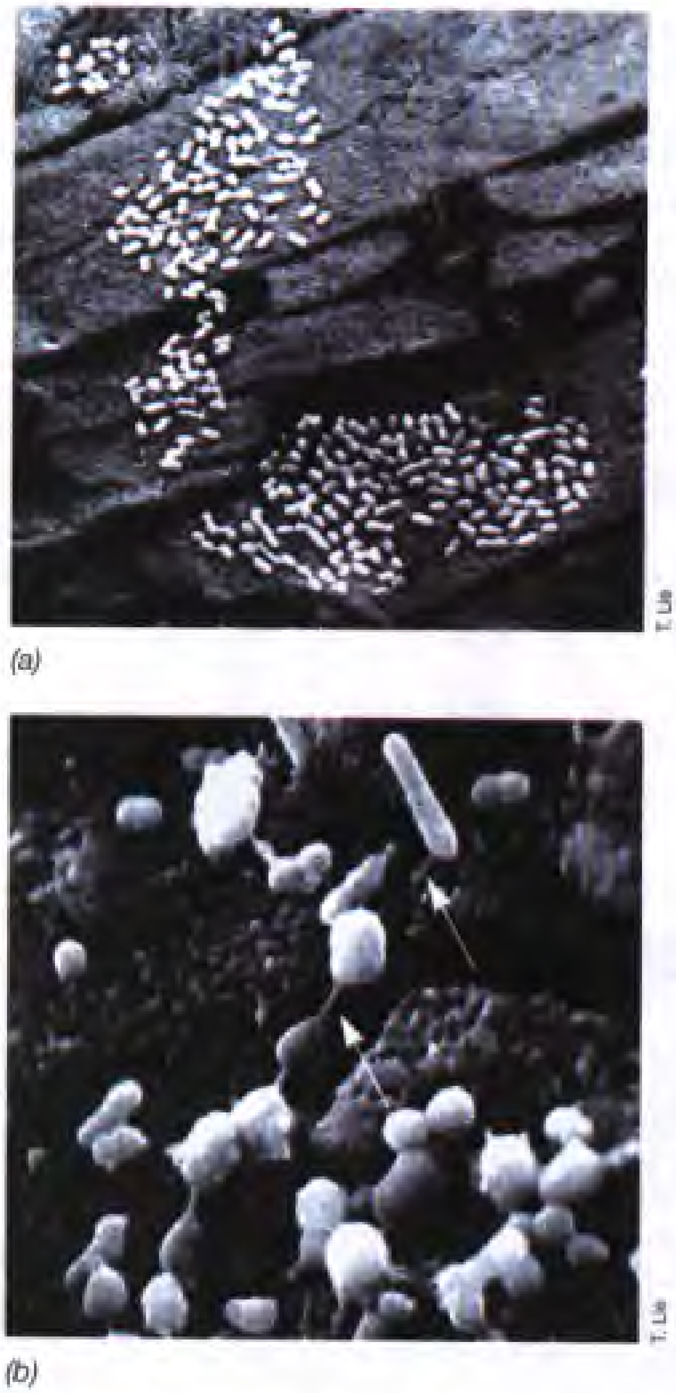


Figura 21.4 (a) Microcolonias bacterianas que crecen sobre una superficie dentaria artificial insertada en una boca durante 6 h. (b) A mayor aumento la misma preparación que se muestra en (a). Obsérvese la diferente morfología de los organismos presentes y el material viscoso (flechas) que «sujetan» a los microorganismos.

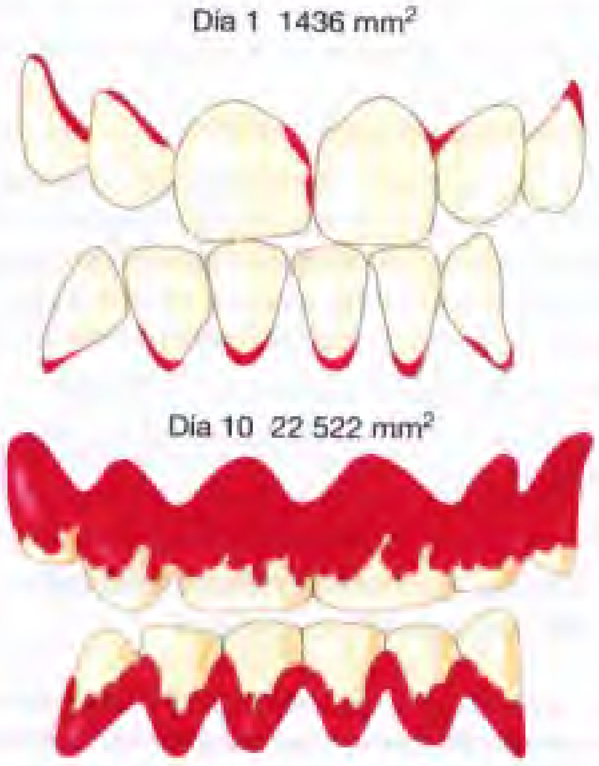


Figura 21.5 Distribución de la placa dentaria tal como muestra la utilización de un agente de revelado, en un diente cepillado (arriba) y sin cepillar (abajo). Los números expresan el área total de la placa dentaria.

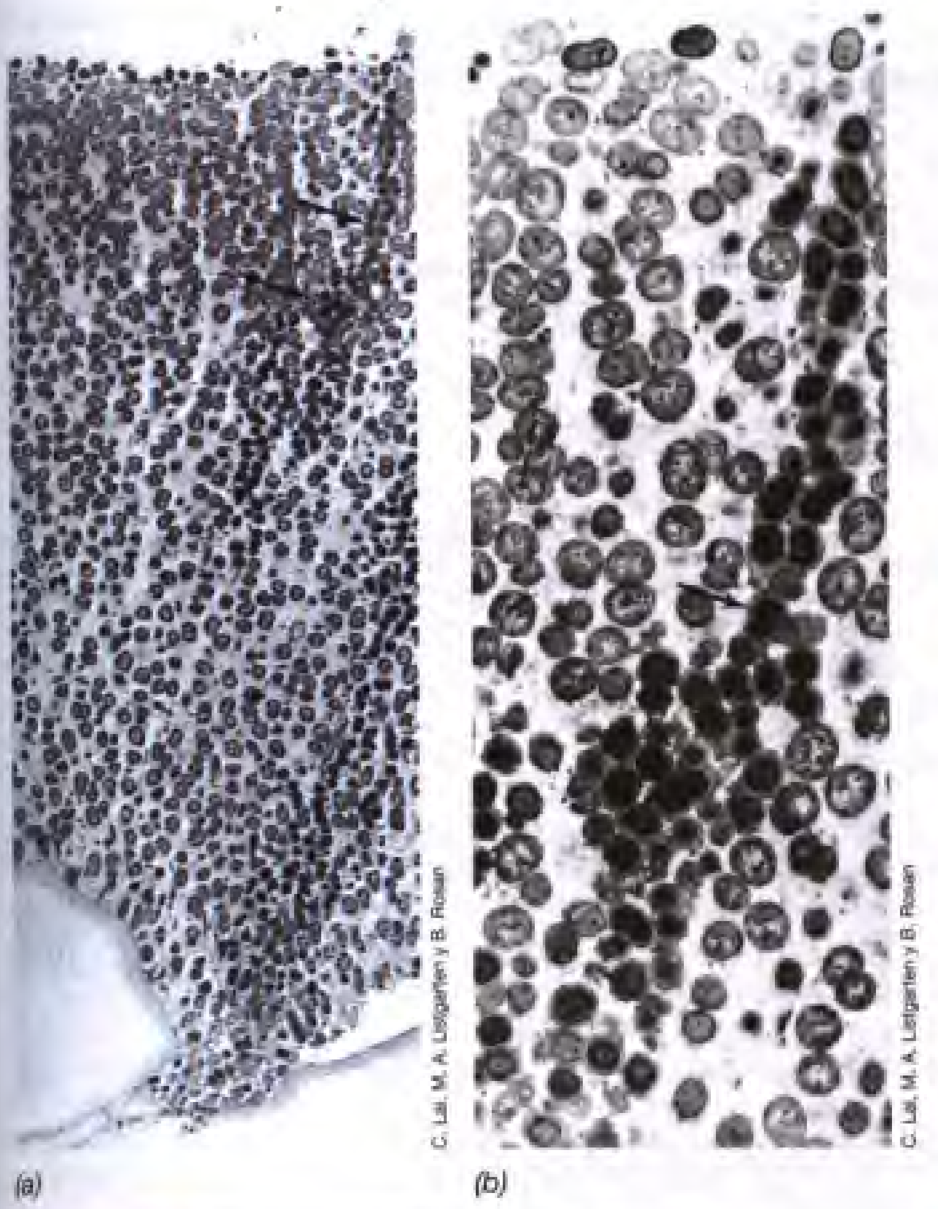
perficies lisas del diente, que están expuestas a la limpieza frecuente por la lengua, mejillas, saliva o el cepillo de dientes o la acción abrasiva de la masticación de los alimentos, son relativamente resistentes a la caries dental. Las superficies dentales a nivel de las hendiduras donde se retienen las partículas de los alimentos son los lugares donde con más frecuencia se deterioran los dientes. Por ejemplo, los perros son muy resistentes al deterioro dental debido a que la forma de sus dientes no favorece la retención de alimentos. Las dietas ricas en azúcar son especialmente *cariogénicas* debido a que las bacterias ácido-lácticas fermentan los azúcares a ácido láctico, que provoca la descalcificación del esmalte dental (*véase* Figura 21.3). Una vez que ha comenzado la rotura del tejido duro, tiene lugar la proteolisis de la matriz del esmalte dentario bajo la acción de las enzimas proteolíticas liberadas por la bacteria. Los microorganismos penetran más allá de la matriz en descomposición, si bien las fases finales del proceso pueden ser mucho más lentas y con frecuencia muy complejas. La estructura del tejido calcificado también juega un papel importante en la extensión de la caries dental. La incorporación del fluoruro en la matriz del cristal de fosfato cálcico hace que la matriz sea más resistente a la descalcificación por ácido. Este hecho explica que los fluoruros se empleen como aditivos en el agua para beber y en los dentífricos para ayudar a controlar el deterioro de los dientes.

Se ha implicado a dos organismos en la caries dental: *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus mutants*. Ambos son bacterias que producen ácido láctico. *S. sobrinus* puede colonizar las superficies lisas del diente debido a su afinidad específica con las glicoproteínas salivales (Figura 21.6), y es probable que este organismo sea el primer implicado en la afectación de las superficies lisas. *S. mutans* se encuentra sobre todo en las hendiduras y pequeñas fisuras, y su capacidad para fijarse a ambas superficies es el resultado de la producción de un polisacárido de dextrano que es extraordinariamente adhesivo (Figura 21.7). *S. mutans* produce dextrano únicamente cuando existe sacarosa, mediante la enzima *dextransacaridasa*:

$$n \text{ Sacarosa} \xrightarrow{\text{Dextransacarida}} \text{Dextrano (glucosa)}_n + n \text{ fructosa}$$

La sacarosa es el azúcar de mesa más común en la dieta de la mayoría de los países desarrollados. Su capacidad para servir como sustrato de la dextransacaridasa es una de las razones por las que la sacarosa es muy cariogénica.

La susceptibilidad a las caries dentales varía mucho según los individuos y está influenciada por los rasgos inherentes tanto al individuo como a la dieta y a otros factores extrínsecos. Estudios sobre la distribución de los estreptococos bucales en el hombre han demostrado una correlación directa entre la presencia de *S. mutans*, y en menor grado de *S. sobrinus*, y la extensión de la caries dental. En


C. Lai, M. A. Listgarten y B. Rosan
C. Lai, M. A. Listgarten y B. Rosan

(a) (b)

Figura 21.6 Micrografías electrónicas de secciones finas de una placa dentaria. La porción inferior es la base de la placa; la parte superior es la porción expuesta en la cavidad bucal. (a) Micrografía electrónica a pocos aumentos. Los organismos son predominantemente estreptococos. La especie *Streptococcus sobrinus* se ha marcado mediante una técnica microquímica con anticuerpos, apareciendo estas células más oscuras que el resto. Se ven como dos cadenas diferentes (flechas). El espesor total de la capa de la placa es de unas 50 μm. (b) Micrografía electrónica de alta resolución que muestra la zona con células de *S. sobrinus* (oscura, flecha). Fíjese en el enorme glicocálix (véase Sección 21.6) que rodea las células de *S. sobrinus*.

Estados Unidos y Europa Occidental, por ejemplo, el 80-90% de toda la población tiene en su dentadura *S. mutans* y la caries dental es un fenómeno prácticamente universal. Por el contrario, no se ve caries dental en los niños de Tanzania presumiblemente debido a factores de la dieta, y en estos individuos no se encuentra *S. mutans* en la placa.

Los microorganismos bucales pueden causar otras infecciones. Las áreas a lo largo de la membrana periodontal o debajo del área gingival (huecos peridontales) (Figura 21.3) pueden infectarse con una gran variedad de microorganismos, causando inflamación (gingivitis) y problemas bucales más serios, destrucción del hueso y enfermedad peridontal. Varios géneros están implicados: bacterias fusiformes anaeróbicas *Capno cytophaga* y la bacteria anaeróbica *Rothia*.

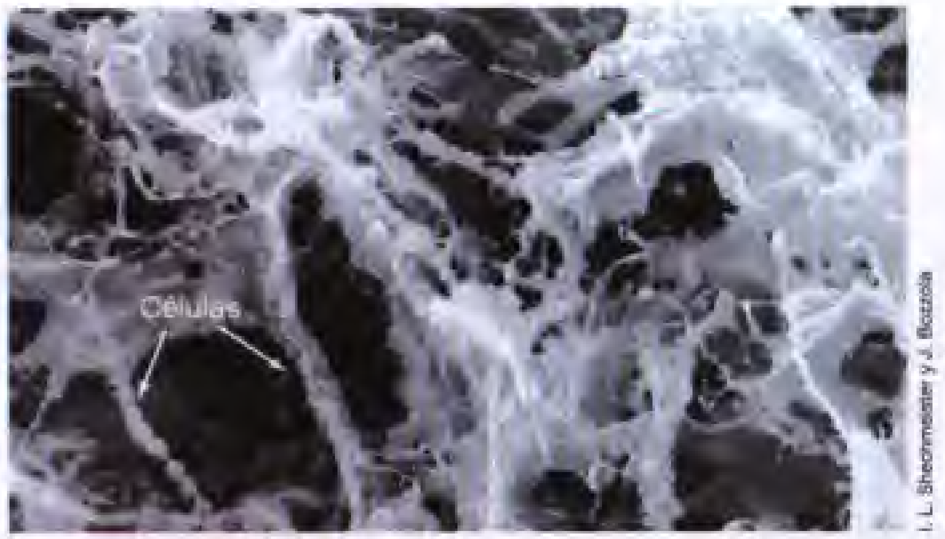


Figura 21.7 Micrografía electrónica de barrido de la bacteria cariógena *Streptococcus mutans*. Puede verse el material viscoso de dextrano formando masas de partículas filamentosas. Las células individuales tienen aproximadamente 1 μm de diámetro.

✓ 21.3 Revisión de conceptos

Las bacterias pueden crecer sobre las superficies dentarias en gruesas capas denominadas placas. En la placa, los microorganismos producen sustancias adherentes que favorecen la futura colonización. Los organismos productores de ácido en la placa lesionan las superficies del diente y se produce la caries dental. Varios microorganismos contribuyen a la caries dental y a la enfermedad periodontal.

- ✓ ¿Cómo llegan a establecerse en la boca los microorganismos anaerobios?
- ✓ ¿Es una enfermedad infecciosa la caries dental? Dé al menos una razón para su respuesta.

21.4 Biota normal (microbiota) del tracto gastrointestinal

En la Figura 21.8, se muestra la anatomía general del tracto gastrointestinal. El tracto gastrointestinal humano, el lugar de la digestión de los alimentos, se compone de estómago, intestino delgado e intestino grueso. El pH de los fluidos del estómago es bajo, aproximadamente pH 2. El estómago puede considerarse, por tanto, como una barrera microbiológica contra la entrada de bacterias extrañas en el tracto intestinal. El recuento de bacterias del contenido gástrico es generalmente bajo y en el estómago no hay apenas biota normal (microbiota). Sin embargo, organismos como *Helicobacter pylori* pueden colonizar la pared del estómago, produciendo úlceras (*véase* Sección 26.10).

El tracto intestinal

El tracto intestinal se compone de *intestino delgado* e *intestino grueso*, que a su vez se subdividen en distintas estructuras anatómicas.

El **intestino delgado** está dividido en dos partes: el *duodeno* y el *íleon*. El *yeyuno* conecta las dos partes. El primero, adyacente al estómago, es ligeramente ácido y recuerda al estómago en cuanto a su biota (microbiota). Desde el duodeno al íleon, el pH se hace progresivamente menos ácido

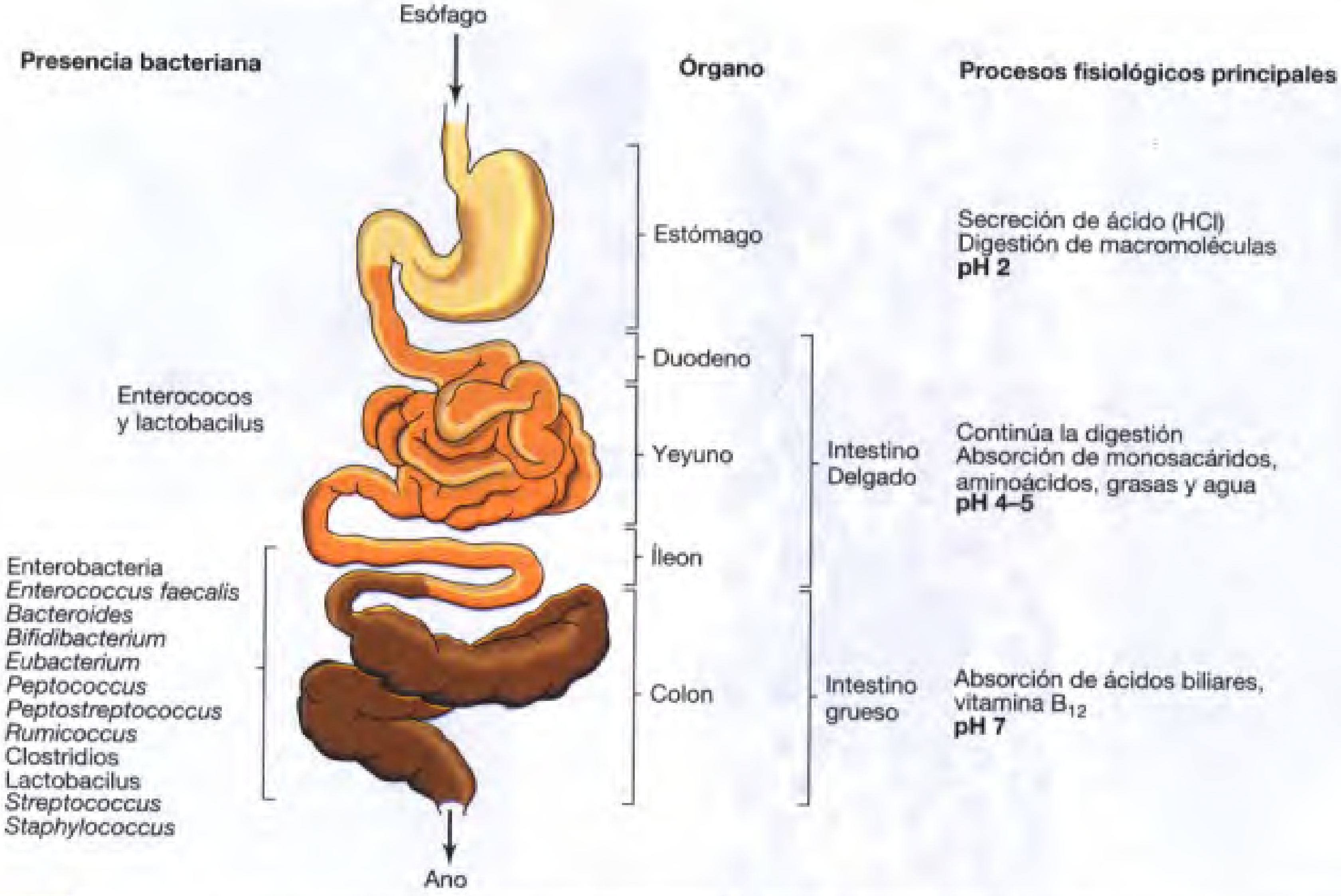

Esófago
Presencia bacteriana
Órgano
Procesos fisiológicos principales
Estómago
Secreción de ácido (HCl)
Digestión de macromoléculas
pH 2
Duodeno
Enterococos
y lactobacilus
Yeyuno
Intestino Delgado
Continúa la digestión
Absorción de monosacáridos, aminoácidos, grasas y agua
pH 4–5
Íleon
Enterobacteria
Enterococcus faecalis
Bacteroides
Bifidibacterium
Eubacterium
Peptococcus
Peptostreptococcus
Rumicoccus
Clostridios
Lactobacilus
Streptococcus
Staphylococcus
Colon
Intestino grueso
Absorción de ácidos biliares, vitamina B12
pH 7
Ano

Figura 21.8 Tracto gastrointestinal mostrando funciones y la distribución de los microorganismos no patógenos en individuos saludables.

y aumenta el número de bacterias. En el íleon inferior, las bacterias se encuentran en la cavidad intestinal (el lumen) mezcladas con material digestivo. Son habituales los recuentos celulares de 10^5-10^7 por gramo.

El íleon conecta con el ciego, la primera parte del **intestino grueso**, y el colon completa el intestino grueso. En el colon, las bacterias están presentes en grandes cantidades y esta región puede considerarse como un recipiente de fermentación especializado. Muchas bacterias viven en el interior de su luz utilizando probablemente como nutrientes algunos productos de la digestión de los alimentos (Tabla 21.1). Los aerobios facultativos como *Escherichia coli* se encuentran en cantidades mucho más pequeñas que otras bacterias; los recuentos totales de aerobios facultativos son, por lo general, inferiores a 10^7 por gramo del contenido intestinal. Las actividades de los aerobios facultativos consumen todo el oxígeno presente, convirtiendo el ambiente del intestino grueso en estrictamente anaerobio y favorable para el crecimiento intenso de anaerobios obligados. Muchos de estos anaerobios son bacilos largos, delgados, Gram negativos con extremos en forma de huso (llamados *fusiformes*) y están fijados por su extremo a las pequeñas indentaciones de la pared intestinal (Figura 21.9). Otros anaerobios obligados incluyen especies de *Clostridium* y *Bacteroides*. El número total de anaerobios obligados es enorme. No son infrecuentes recuentos de 10^{10}-10^{11} células/g

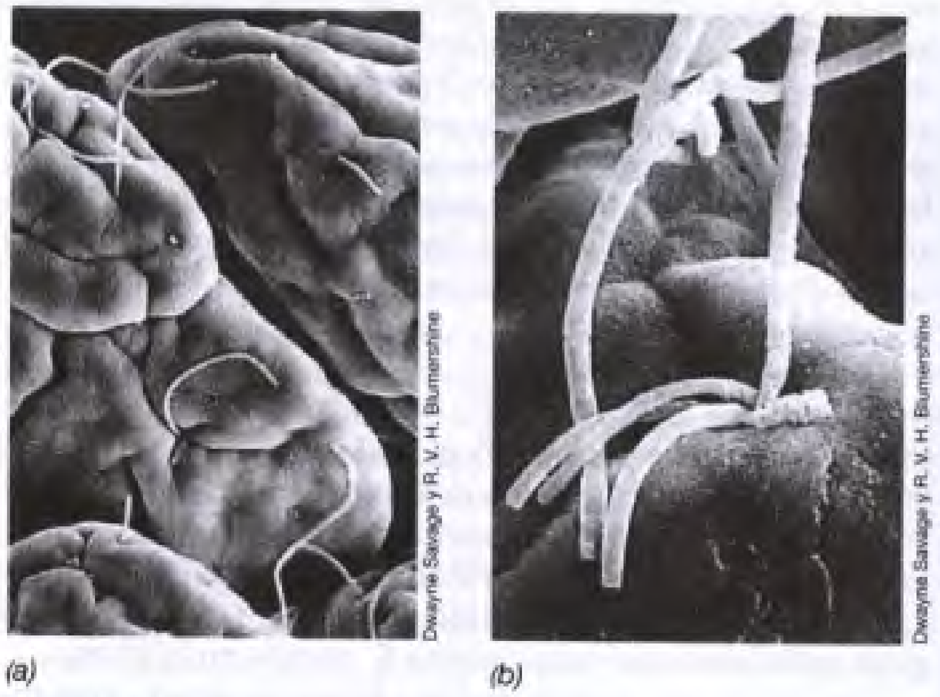

Dwayne Savage y R. V. H. Blumershine
Dwayne Savage y R. V. H. Blumershine

Figura 21.9 Micrografías electrónicas de barrido de la comunidad microbiana sobre la superficie del epitelio columnar en el íleo del ratón. (a) Una panorámica a pequeños aumentos. Obsérvese la bacteria larga, filamentosa, *fusiforme*, localizada sobre la superficie. (b) A mayor aumento se observan distintos filamentos fijados en una sola depresión. Fíjese que el anclaje se produce sólo en el extremo de los filamentos. Las células individuales tienen una longitud de 10-15 µm.

del contenido intestinal, correspondiendo la mayoría de los anaerobios intestinales obligados a distintas especies de *Bacteroides*. Además, *Enterococcus faecalis* está casi siempre presente en cantidades significativas.

La microbiota intestinal en el hombre también puede variar cualitativamente dependiendo de la dieta. Las personas que consumen una cantidad considerable de carne muestran cantidades mucho mayores de *Bacteroides* y mucho menores de bacterias coliformes y de bacterias del ácido láctico, que las que tienen una dieta vegetariana. En la Figura 21.8, se da una visión general de los microorganismos del tracto gastrointestinal.

La biota (microbiota) intestinal ejerce una marcada influencia sobre las funciones del hospedador, llevando a cabo una amplia variedad de reacciones metabólicas (Tabla 21.2). Entre éstas está la producción de la vitamina B12 y de la vitamina k. Estas dos vitaminas no son producidas por los humanos, sino son absorvidas por el intestino y sintetizadas por la biota normal (microbiota). Los esteroides son producidos en el hígado y liberados al intestino por la vesícula biliar y absorbidos por el intestino. Otras partículas generadas por la acción fermentadora y los microorganismos metanogénicos incluyen la producción de gas (flato) y la producción de olor, listados en la Tabla 21.12. Por todos estos productos metabólicos, la composición de la biota normal (microbiota) y la dieta influyen sobre el tipo y la cantidad de componentes producidos.

Durante el paso de los alimentos por el tracto gastrointestinal, se absorbe el agua del material digerido que progresivamente llega a hacerse más concentrado y se transforma en heces. Las *bacterias* constituyen cerca de un tercio del peso de la materia fecal. Los organismos que viven en la luz del intestino grueso son continuamente arrastrados corriente abajo por el trasiego del material y, si el inóculo bacteriano se conserva, estas bacterias que se pierden deben ser sustituidas por un nuevo crecimiento (*véase* Sección 6.7). El tiempo necesario para el paso del material a lo largo de todo el tracto gastrointestinal es aproximadamente de 24 h en el hombre; la velocidad de crecimiento de bacterias en la luz del intestino hace que la población bacteriana se duplique una o dos veces por día.

TABLA 21.2 Contribuciones bioquímicas/metabólicas de los microorganismos intestinales

Síntesis de vitaminas	Producto: tiamina, riboflavina piridoxina, B_{12}, K
Producción de gas	Producto: CO_2, CH_4, H_2
Producción de olor	Producto: H_2S, NH_3, aminas, indol, escatol (ácidos biliares), ácido propiónico, ácido butírico
Producción de ácidos	Producto: ácidos acético, propiónico, butírico
Reacciones de glicosidasa	Enzimas: β-glucoronidasa, β-galactosidasa, β-glucosidasa, α-glucosidasa, α-galactosidasa
Metabolismo esteroide (ácidos biliares)	Proceso: esterificación, deshidroxilación, oxidación, reducción, inversión

Cuando se administran antibióticos por vía oral, se puede inhibir el crecimiento de la biota normal (microbiota) así como el de los patógenos; después, el movimiento continuado del contenido intestinal conduce a la pérdida de las bacterias preexistentes y a la esterilización virtual del tracto intestinal. En ausencia de biota normal (microbiota) cambian las condiciones microambientales del intestino grueso, y pueden establecerse microorganismos oportunistas tales como *Staphylococcus*, *Proteus*, o la levadura *Candida albicans*. Estos organismos habitualmente no crecen en el tracto intestinal porque no son capaces de competir con la biota normal (microbiota). Ocasionalmente, el establecimiento de estos patógenos oportunistas puede llevar a una alteración perjudicial de la función digestiva o incluso a la enfermedad. Tras la supresión de la antibioterapia, termina por reestablecerse la biota normal (microbiota) pero, casi siempre, sólo después de un considerable periodo.

Gases intestinales

El gas producido en los intestinos, denominado *flato*, es el resultado de la acción fermentativa y metanogénica de los microorganismos. Algunos alimentos pueden ser metabolizados en los intestinos por bacterias fermentativas, originando la producción de hidrógeno (H_2) y dióxido de carbono (CO_2). En aproximadamente un tercio de los adultos normales se encuentran microorganismos metanógenos en los intestinos (*véase* Sección 13.4). Los metanógenos convierten el H_2 y el CO_2 producidos por otros microorganismos intestinales en metano (CH_4). Los adultos normales expelen diariamente de sus intestinos varios cientos de mililitros de gas, de los que aproximadamente la mitad corresponde a N_2 procedente del aire tragado.

✓ 21.4 Revisión de conceptos

El estómago es muy ácido y representa una barrera muy efectiva para la mayor parte de los microorganismos. El tracto intestinal varía de ligeramente ácido a neutro y da cobijo a diversas y grandes poblaciones de microorganismos, en variadas condiciones nutricionales y ambientales.

- ✓ ¿Por qué el intestino delgado es más adecuado para el crecimeinto de anareobios facultativos que el intestino grueso?
- ✓ Identifique varios componentes esenciales que producen la biota normal (microbiota) del intestino. ¿Qué sucedería si estos microorganismos son eliminados por el uso de antibióticos?

21.5 Biota normal (microbiota) de otras regiones del cuerpo

Todas las membranas mucosas favorecen el crecimiento de un grupo especializado de microorganismos. Estos organismos forman parte del ambiente local normal y son típicos del tejido sano. En muchos casos, los microorganismos potencialmente patógenos no pueden colonizar las membranas mucosas debido a la presencia de la población residente normal de microorganismos. En esta sección, expondremos dos de tales ambientes mucosos y sus microorganismos residentes.

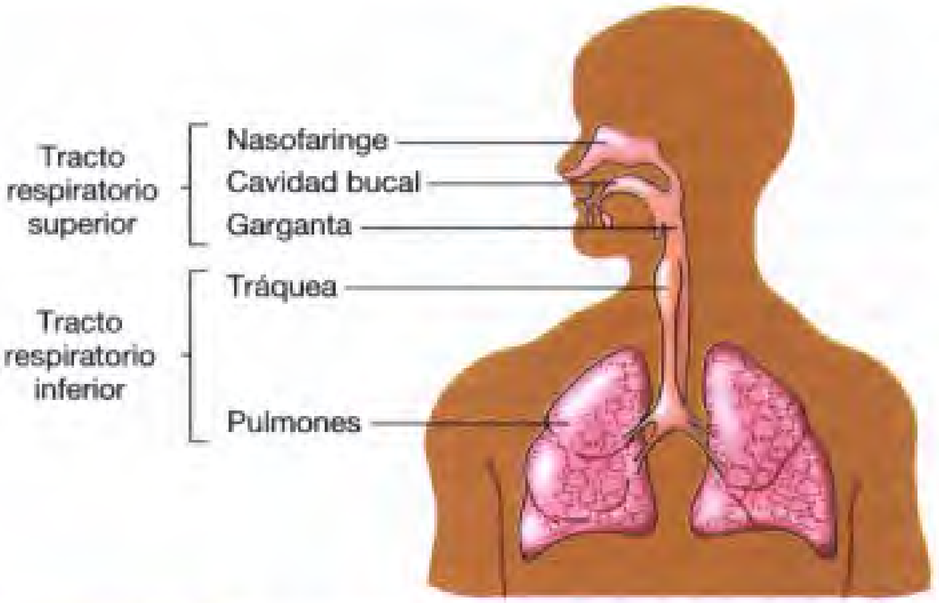
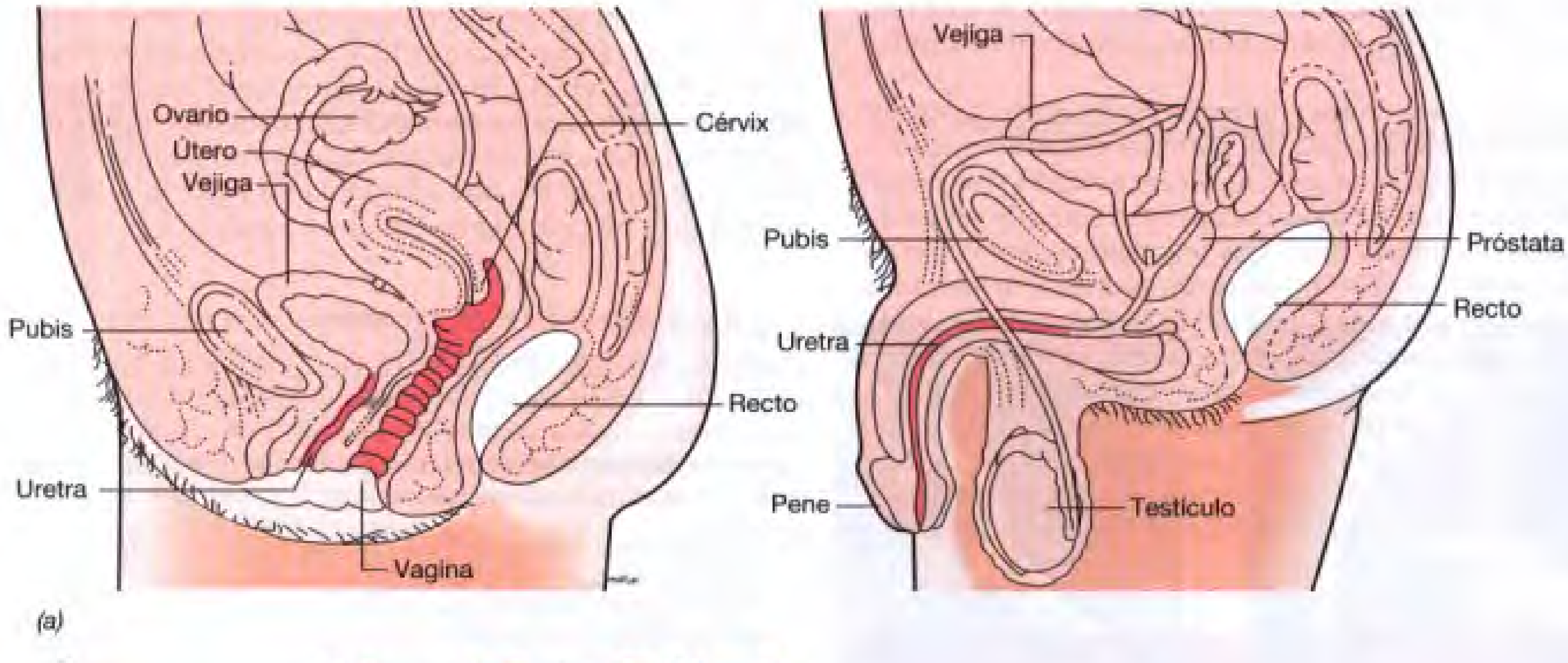

Tracto respiratorio superior
Nasofaringe
Cavidad bucal
Garganta
Tracto respiratorio inferior
Tráquea
Pulmones

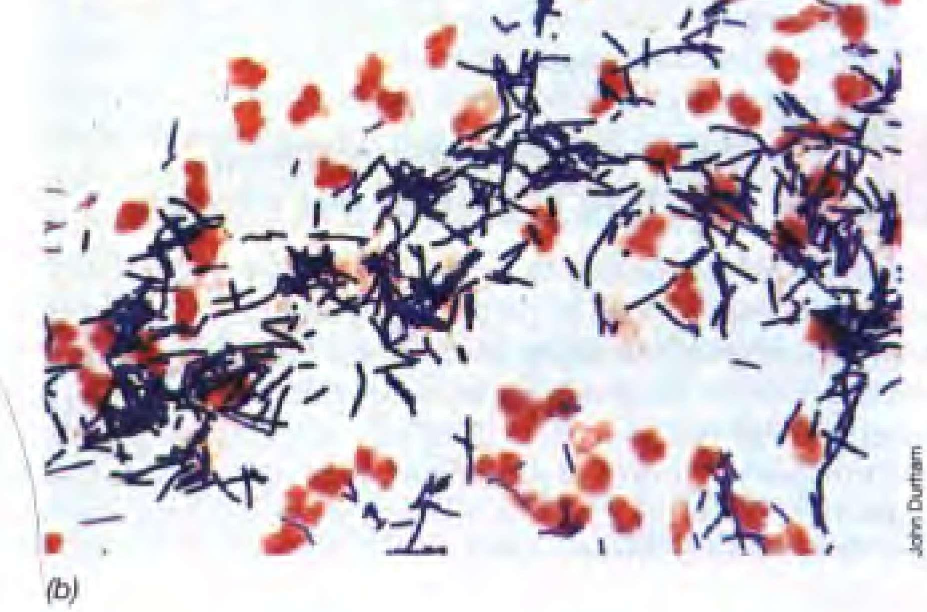
Figura 21.10 El tracto respiratorio. El tracto respiratorio superior tienen un porcentaje alto de microorganismos, pero el tracto respiratorio inferior tiene un porcentaje bajo de microorganismos, salvo que haya infección (*véase* Figura 26.2).

Tracto respiratorio

La anatomía del tracto respiratorio se muestra en la Figura 21.10 (*véase* Figura 26.2). En el **tracto respiratorio superior** (nasofaringe, cavidad bucal y garganta) los microorganismos viven primariamente en áreas bañadas con las secreciones de las membranas mucosas. Las bacterias penetran en el tracto respiratorio superior con el aire durante la respiración, si bien la mayor parte de ellos son atrapados en los corredores nasales y expelidos nuevamente con las secreciones nasales. Los organismos residentes más frecuentes son los estafilococos, estreptococos, bacilos diftéricos y cocos Gram negativos. Las bacterias potencialmente dañinas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Corynebacterium diphteriae* constituyen a menudo parte de la biota normal (microbiota) de la nasofaringe de los individuos sanos (Tabla 21.1). Estos individuos son *portadores* de patógenos, pero habitualmente no adquieren la enfermedad debido a que otros microorganismos residentes compiten con éxito por los recursos y limitan el crecimiento del patógeno. El sistema inmune local (*véase* Sección 22.8) es particularmente activo en las super-


Ovario
Útero
Vejiga
Cérvix
Pubis
Recto
Uretra
Vagina
Vejiga
Pubis
Próstata
Recto
Uretra
Pene
Testículo

(a)


John Durham

(b)

Figura 21.11 (a) Los tractos genitourinario del hombre y la mujer mostrando las zonas (color) en las que los microorganismos crecen habitualmente. Nótese que los tractos superiores del hombre y la mujer normalmente son estériles. (b) Tinción de Gram de *Lactobacillus acidophilus*, el organismo predominante en la vagina de la mujer desde la adolescienda a la menopausia. Los bacilos miden 3-4 μm de longitud. Los tractos de las mujeres jóvenes y mayores son menos acídicos y están poblados por un grupo heterogéneo de microorganismos que crecen a pH neutros o ligeramente alcalinos.

ficies mucosas y puede también inhibir el crecimiento de los patógenos.

El **tracto respiratorio inferior** (tráquea, bronquios y pulmones) es básicamente estéril, a pesar del gran número de organismos potencialmente capaces de alcanzar esta región durante la respiración. Las partículas de polvo que son bastante grandes se retienen en el tracto respiratorio superior. A medida que el aire circula por el tracto respiratorio inferior su intensidad de flujo disminuye notablemente y los organismos se asientan sobre las paredes de las vías. Las paredes del tracto respiratorio en su conjunto están revestidas de un epitelio ciliado y los cilios que baten en sentido ascendente empujan a las bacterias y a otras partículas hacia el tracto respiratorio superior, donde a continuación son expelidas con la saliva y las secreciones nasales. Sólo las partículas de un tamaño inferior a las 10 μm de diámetro son capaces de llegar a los pulmones.

Tracto urogenital

La Figura 21.11*a* muestra las principales características anatómicas de los tractos urogenitales del hombre y la mujer. En ambos, la vejiga suele ser estéril pero las células epiteliales que tapizan la uretra son colonizadas por bacilos y cocos Gram negativos aerobios facultativos (Tabla 21.1). Estos organismos, entre los que se incluye *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* y otros, pueden a veces convertirse en *patógenos oportunistas*. Estos organismos están presentes normalmente en el organismo o en el medio ambiente y en circunstancias normales no son patógenos. Cambios en el cuerpo, como modificaciones en el pH, permiten que estos organismos se multipliquen y lleguen a ser patógenos. Habitualmente dichos organismos causan infecciones del tracto urinario, sobre todo en mujeres.

La vagina de la mujer adulta, en condiciones normales, es débilmente ácida y contiene cantidades significativas de glucógeno (un polisacárido). *Lactobacillus acidophilus* fermenta el glucógeno y produce ácido. Se encuentra ordinariamente en la vagina y puede ser responsable de la acidez (*véanse* Figura 21.11 y Sección 12.19). También pueden estar presentes otros organismos —levaduras (*Torulopsis* y *Candida*), estreptococos y *E. coli*—. Antes de la pubertad, la vagina femenina es alcalina y no produce glucógeno, no existe *L. acidophilus* y en la biota (microbiota) predominan los estafilococos, estreptococos, difteroides y *E. coli*. Después de la menopausia desaparece el glucógeno, se eleva el pH y la biota (microbiota) se parece otra vez a la que se encuentra antes de la pubertad.

✓ 21.5 Revisión de conceptos

La presencia y el mantenimiento de una población normal de microorganismos no patógenos, en los tractos respiratorio y urogenital, es esencial para el funcionamiento normal de los órganos y con frecuencia evita la colonización de los patógenos.

- ✓ En ocasiones se encuentran patógenos en la biota normal (microbiota) del tracto respiratorio superior. ¿Porqué no causan enfermedad en algunos casos?
- ✓ ¿Por qué se encuentra *Lactobacillus* en el tracto urogenital de las mujeres adultas normales?

II INTERACCIONES DAÑINAS DE MICROORGANISMOS CON HUMANOS

Muchas de las interacciones son dañinas para el hospedador y causan enfermedad. Aquí revisaremos los mecanismos usados por los microorganismos para causar daño al hospedador. La patogénesis es la capacidad de los microorganismos para causar enfermedades; empieza por la adherencia de los microorganismos a las células del hospedador, seguida de la colonización y crecimiento causando daño en el hospedador. Los microorganismos que causan enfermedades utilizan varias estrategias para provocar **virulencia**, que es la capacidad del patógeno de producir una enfermedad (Figura 21.12). Consideramos primero los factores que ocasionan la entrada del patógeno en el hospedador.

21.6 Entrada del patógeno en el hospedador

Un patógeno, por lo general, debe alcanzar los tejidos del hospedador y multiplicarse antes de ocasionar un perjuicio. En la mayoría de los casos, esto requiere que el organismo penetre

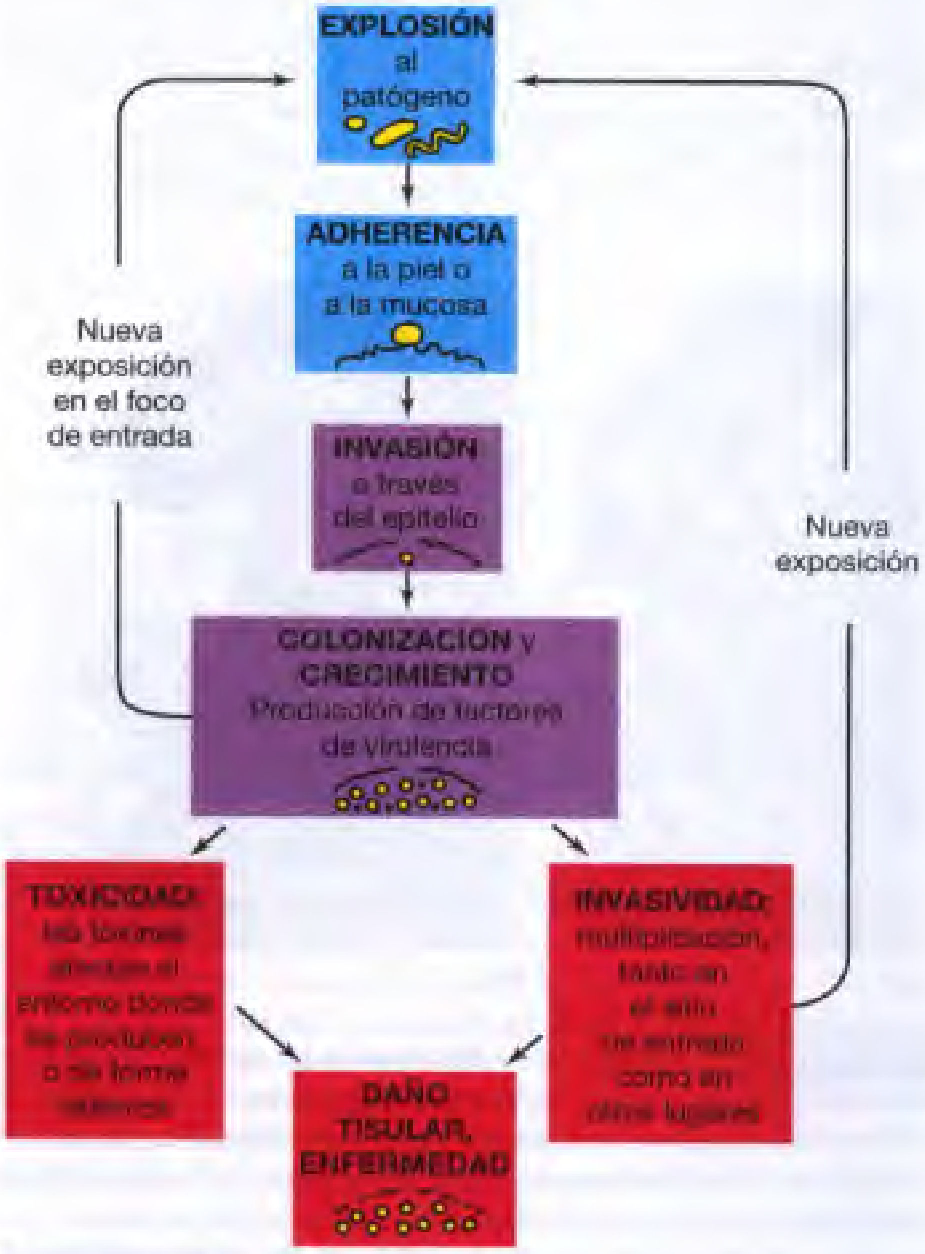

EXPLOSIÓN al patógeno
ADHERENCIA a la piel o a la mucosa
INVASIÓN a través del epitelio
COLONIZACIÓN y CRECIMIENTO Producción de factores de virulencia
Nueva exposición en el foco de entrada
Nueva exposición
TOXICIDAD: las toxinas afectan al entorno donde se producen o de forma sistémica
INVASIVIDAD: multiplicación, tanto en el sitio de entrada como en otros lugares
DAÑO TISULAR, ENFERMEDAD

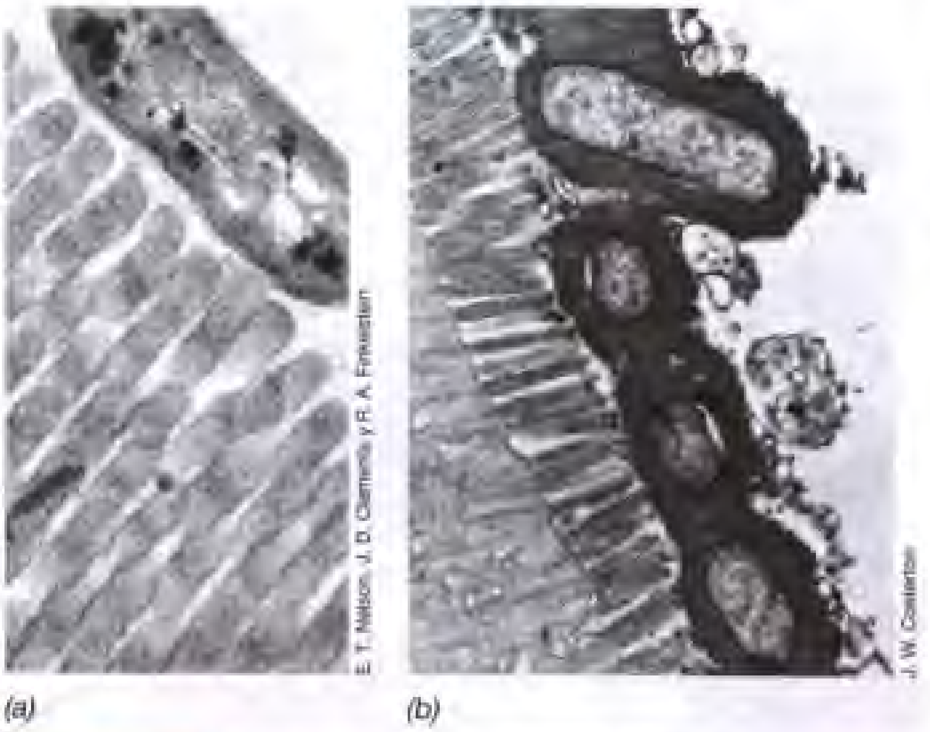
Figura 21.12 Microorganismos y patogenia. La presencia de microorganismos en el hospedador no siempre produce enfermedad.

la piel, membranas mucosas o el epitelio intestinal, superficies que normalmente actúan como barreras microbianas.

Adherencia específica

La mayor parte de las infecciones microbianas comienzan por heridas en la piel, en las membranas mucosas del tracto respiratorio, gastrointestinal o genitourinario. Existen considerables evidencias que indican que las bacterias o los virus que son capaces de poner en marcha la infección deben primero adherirse *específicamente* a las células epiteliales (Figura 21.13), a través de interacciones proteína-proteína entre el patógeno y las céluals del hospedador. Un microorganismo infectante no se adhiere a todas las células epiteliales por igual, sino que se adhiere selectivamente a las células en la zona particular del cuerpo por donde habitualmente penetra. Por ejemplo, *Neisseria gonorrhoeae*, el agente causal de la enfermedad de transmisión sexual gonorrea (*véase* Sección 26.12), se adhiere mucho más fuertemente al epitelio urogenital que a otros tejidos, usando una proteína de superficie llamada *Opa*. La célula del hospedador une específicamente a Opa con una proteína llamada CD66, que sólo se encuentra en humanos. Por tanto, *N. gonorrheae* interacciona exclusivamente con la célula diana a través de un par ligando-receptor. Este principio conlleva a la especificidad del hospedador. En muchos, casos, una cepa bacteriana que normalmente infecta al hombre se adhiere más fuertemente a células epiteliales humanas adecuadas que a células semejantes en otro animal (por ejemplo, la rata); mientras que una cepa que específicamente coloniza a la rata se adhiere más firmemente a las células de la rata que a las células humanas.

Algunas moléculas de adhesión no están unidas covalentemente a la bacteria. Normalmente son polisacáridos sintetizados y secretados por la bacteria (*véase* Sección 4.13). Un polímero denso es una capa bien definida que rodea la célula denominada **cápsula** (*véase* Figura 26.3). Algunas de estas macromoléculas son polisacáridos presentes en la naturaleza y forman una red pegajosa de fibras denominada **glicocálix** (*véase* Figura 21.13*b*), mientras que una difusa masa de fibras que no se une a ninguna célula se denomina **capa viscosa** (*véase* Figura 21.4*b*). Estas estructuras pueden ser importantes para la adherencia, no sólo para los tejidos del hospedador, sino también para el anclaje a otras bacterias. Además, las capas pueden proteger a la bacteria de los mecanismos de defensa del hospedador, por ejemplo la fagocitosis de macrófagos y otras células (*véase* Sección 22.2).


(a)

(b)

E. T. Nelson, J. D. Clements y R. A. Finkelstein

J. W. Costerton

Figura 21.13 Adherencia de patógenos a los tejidos animales. (a) Micrografía electrónica de transmisión de una sección fina de *Vibrio cholerae* adhiriéndose al borde en cepillo de las vellosidades del conejo. Obsérvese la ausencia de capa externa (glicocálix). (b) *Escherichia coli* enteropatógena en un modelo de infección en ternera recién nacida. Las células bacterianas están unidas al borde en cepillo de las vellosidades de la ternera mediante un vasto glicocáliz. Los bacilos miden aproximadamente 0,5 μm de diámetro.

Las *fimbrias* y los pelos (*pili*) (*véase* Sección 4.13) son estructuras bacterianas (Figura 21.14) que también pueden interaccionar en el proceso de anclaje. Por ejemplo, los pelos de *Neisseria gonorrhoeae* juegan un un papel crítico en la fijación de este organismo al epitelio urogenital y las cepas de *Escherichia coli* (Figura 21.14) con fimbrias causan infecciones del tracto urinario con más frecuencia que las cepas que carecen de fimbrias. Entre las fimbrias mejor caracterizadas están las denominadas *fimbrias de tipo I* de enterobacterias (*Escherichia, Klebsiella, Salmonella* y *Shigella*). Las fimbrias de tipo I miden 0,21 μm de longitud y 7 nm de anchura, y se distribuyen uniformemente sobre la superficie de las células. Los pelos son generalamente más largos y menos abundantes que las fimbrias, sobre la superficie de la bacteria. Tanto los pelos como las fimbrias actúan uniéndose a glicoproteínas de la célula hospedadora. Las fimbrias de tipo I participan en la fijación a través de la unión de residuos de manosa de las glicoproteínas celulares específicas del hospedador para iniciar el proceso de anclaje.

A partir de estudios de diarreas causadas por *Escherichia coli*, parece evidente la existencia de interacciones específicas entre el epitelio de la mucosa y el patógeno. La mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas y forman parte de la biota normal (microbiota) del ciego y del colon. Varias cepas están presentes en el cuerpo humano al mismo tiempo. Un gran número de estas cepas no patógenas se liminan con la materia fecal. Dichas cepas poseen estructuras

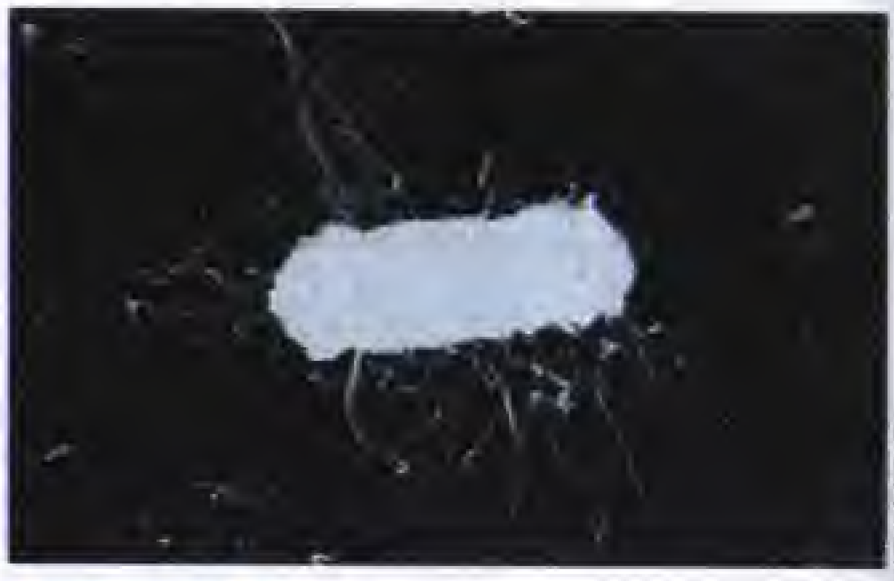


Figura 21.14 Micrografía electrónica con sombreado del bacilo *Escherichia coli* mostrando fimbrias del tipo P. Las fimbrias de tipo P asemejan a las fimbrias de tipo I, aunque son más largas. La célula que se muestra tiene una anchura aproximada de 0,5 μm.

de superficie específicas denominadas *antígenos del factor de colonización* (*CFA*), que son proteínas fímbricas implicadas en la fijación específica a la mucosa del intestino *delgado*, donde pueden colonizar y producir enterotoxinas (*véase* Sección 21.9) que causan diarrea y otras enferemedades (*véase* Sección 29.7). Las cepas normales no patógenas de *E. coli* también tienen CFA. Algunos factores importantes para adherencia bacteriana se muestran en la Tabla 21.3

Invasión

Algunos microorganismos son patógenos solamente por las toxinas que producen. Estos organismos no necesitan llegar a los tejidos del hospedador y los expondremos separadamente (*véanse* Secciones 21.8 y 21.9). Sin embargo, la mayor parte de los patógenos penetran en el epitelio e inician el proceso patogénico denominado *invasión*. En el sitio de entrada, generalmente pequeñas heridas o lesiones de la piel o de las superficies mucosas, lo más frecuente es que se se establezcan y se desarrollen. También pueden multiplicarse en las superficies mucosas intactas, sobre todo si la biota normal (microbiota) está alterada o ha desaparecido, por ejemplo, por tratamiento antimicrobiano. Los patógenos pueden entonces colonizar con más rapidez el tejido y comenzar el proceso invasivo. Igualmente, el patógeno puede desarrollarse en lugares alejados del sitio original de entrada. El acceso a estos lugares distantes, generalmente interiores, se realiza por la sangre o a través del sistema linfático (*véase* Sección 22.1).

TABLA 21.3 Principales factores de adherencia que facilitan la fijación de patógenos microbianos a los tejidos del hospedador[a]

Factor	Ejemplo
Glicocálix/cápsula/cápsula viscosa (*véanse* Sección 4.13 y Figura 21.13)	Patógenos de *Escherichia coli*, el glicocálix promueve adherencia al borde en cepillo de las vellosidades intestinales. La unión a la superficie dental por *Streptococcus mutans*, mediada por el glicocalix y el dextrano.
Proteínas de adherencia	La proteína M en la superficie de *Streptococcus pyogenes* se une al receptor de la mucosa respiratoria. *Neisseria gonorrhoeae* facilita con la proteína Opa la unión a receptores del epitelio urogenital.
Ácido lipoteicoico (*véanse* Sección 4.8 y Figura 4.32)	Junto con la proteína M de *Streptococcus pyogenes* facilita la unión al receptor de la mucosa respiratoria.
Fimbrias (pili) (*véanse* Sección 4.13 y Figura 21.14)	Los pili de *Neisseria gonorrhoeae* facilitan la unión a receptores del epitelio urogenital. Especies de *Salmonella*, las fimbrias de tipo I facilitan la unión al epitelio del intestino delgado. Los patógenos de *Escherichia coli*, los antígenos del factor de colonización (CFAs), que son fímbricos, facilitan la unión al epitelio del intestino delgado.

[a] En la mayoría de los casos, los receptores en los tejidos del hospedador son glucoproteínas o lípidos complejos como gangliósidos o globósidos.

✓ 21.6 Revisión de conceptos

El primer paso para que los patógenos alcancen los tejidos del hospedador es la adherencia a moléculas específicas del hospedador, que habitualmente se encuentran sobre las superficies mucosas. La invasión se inicia en el lugar de la adherencia y puede extenderse por todo el hospedador a través de los sistemas circulatorios.

- ✓ ¿Por qué las moléculas CFA de *Escherichia coli* promueven la adherencia a las mucosas?
- ✓ ¿Cómo inicia la invasión la adherencia?

21.7 Colonización y crecimiento

Si un patógeno llega a los tejidos debe multiplicarse. El proceso se llama **colonización**. Generalmente, la carga microbiana (inóculo) inicial es insuficiente para producir un daño; debe encontrar en el hospedador los nutrientes y las condiciones ambientales adecuados. Temperatura, pH y potencial de reducción, son factores ambientales que influyen en el crecimiento del patógeno, pero el más importante es la disponibilidad de nutrientes microbianos en los tejidos del hospedador. Aunque pudiera parecer que un hospedador vertebrado es un paraíso nutricional para los microorganismos, no todos los nutrientes son igual de abundantes. Es frecuente que los nutrientes solubles como azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos sean escasos, y que se vean favorecidos los organismos capaces de utilizar fuentes complejas de nutrientes como el glucógeno. No todas las vitaminas, y otros factores de crecimiento, se necesitan en un aporte adecuado en todos los tejidos y en cualquier momento. Por ejemplo, *Brucella abortus*, puede crecer lentamente en la mayor parte de los tejidos de vacas infectadas si bien en la placenta el crecimiento es muy rápido, provocando el aborto. La causa de esta especificidad radica en que la placenta presenta una elevada concentración de eritritol, un nutriente que es un potente estimulante del crecimiento de *B. abortus* (*véase* Tabla 21.6).

Los elementos traza también pueden ser escasos pudiendo afectar al establecimiento del patógeno. Por ejemplo, parece bastante evidente la influencia del *hierro* sobre el crecimiento microbiano. Proteínas específicas denominadas *transferrina* y *lactoferrina*, presentes en los animales, se unen estrechamente al hierro y lo transportan por todo el cuerpo. La afinidad que presentan estas proteínas por el hierro es tal que es habitual el déficit de hierro en los microorganismos; de hecho, la administración de una sal de hierro soluble a un animal infectado puede aumentar mucho la virulencia de algunos patógenos. Como se indica en la Sección 5.1, multitud de bacterias producen compuestos quelantes del hierro (*sideróforos*) que les ayudan a obtener hierro a partir del ambiente. Algunos quelantes de hierro aislados de bacterias patógenas son tan eficaces que realmente sustraen el hierro de las proteínas animales fijadoras de hierro. Por ejemplo, un sideróforo denominado *aerobactina*, producido por algunas cepas de *Escherichia coli* y codificado por el plásmido Col V (*véase* Sección 10.8), secuestra con facilidad el hierro unido a la transferrina.

Localización en el cuerpo

Después de su entrada inicial, el organismo suele permanecer localizado y se multiplica, produciendo un pequeño

UNIVERSIDAD DE TALCA
BIBLIOTECA CENTRAL

foco de infección como un divieso, o un grano que generalmente está causado por infecciones de la piel debidas a *Staphylococcus* (*véase* Sección 26.9). Otra posibilidad es que los organismos puedan pasar a través de los vasos linfáticos y depositarse en los ganglios linfáticos. Si un organismo alcanza la sangre, llegará a distribuirse por todo el cuerpo, con el microorganismo creciendo en una serie de tejidos. Si se produce en los tejidos un crecimiento bacteriano masivo, puede ocurrir que algunos organismos pasen a la sangre en grandes cantidades, una situación que se denomina **bacteriemia**. Las infecciones generalizadas de este tipo comienzan casi siempre como una infección localizada en una zona de un órgano específico.

✓ *21.7 Revisión de conceptos*

Un patógeno debe acceder a los nutrientes necesarios y a las condiciones de crecimineto necesarias para poder colonizar y crecer en cantidades suficientes en el tejido del hospedador. Los organismos deben crecer localmente en el sitio de invasión, o pueden esparcirse por el cuerpo.

- ✓ ¿Por qué la colonización y el crecimiento son necesarios para el éxito de la mayoría de los patógenos?
- ✓ ¿Qué factores del hospedador limitan o aceleran la colonización y el crecimiento de los microorganismos en el lugar de invasión?

21.8 Virulencia

La **virulencia** es la habilidad relativa de un parásito para causar enfermedad y aquí se discutirán, los métodos básicos para medir la virulencia. Luego se aportarán ejemplos específicos de microorganismos particularmente virulentos y se resaltarán los métodos de los organismos para potenciar su virulencia.

Medición de la virulencia

La virulencia de un patógeno puede ser valorada por estudios experimentales de la LD_{50}. La LD_{50}, o dosis letal 50, es un patógeno que mata al 50% de los animales de experimentación. Los patógenos que son muy virulentos normalmente muestran habilidad para matar al 100%, pero muestran pocas diferencias con la dosis del 50%. Esto se ilustra en la Figura 21.15 que muestra la infección de ratones por *Stretococcus* y *Salmonella*. Muy pocas células de *Stretococcus pnemoniae* son necesarias para matar, una vez que algunas células hayan establecido la virulencia. En realidad, la dosis letal LD_{50} para este organismo es muy difícil de establecer, porque algunas células del patógeno matan. Por el contrario, *Salmonella typhimurium* también un patógeno de ratones, pero mucho menos virulento, y el número de patógenos necesarios para matar al 100% de la población es más de 100 veces mayor que el número que se requiere para matar la LD_{50}.

Cuando los patógenos se mantienen en condiciones de cultivo de laboratorio, y no son reproducidos en animales, su virulencia disminuye frecuentemente, y puede llegar a perderse del todo. Se dice que tales microorganismos están atenuados. La atenuación ocurre probablemente porque los mutantes no virulentos pueden crecer más rápidamente, por lo que después de repetidas transferencias en medio fresco, tales mutantes se van seleccionando favorablemente. La atenuación ocurre más a menudo cuando las condiciones no son favorables para el patógeno. Los organismos atenuados, cuando se reinyectan a hospedador, adquieren de nuevo la virulencia, pero en muchos casos la pérdida de virulencia es para siempre. Las cepas atenuadas normalmente se utilizan para producir vacunas, en especial las vacunas víricas (*véase* Sección 22.11). El sarampión y las paperas se componen de virus atenuados.

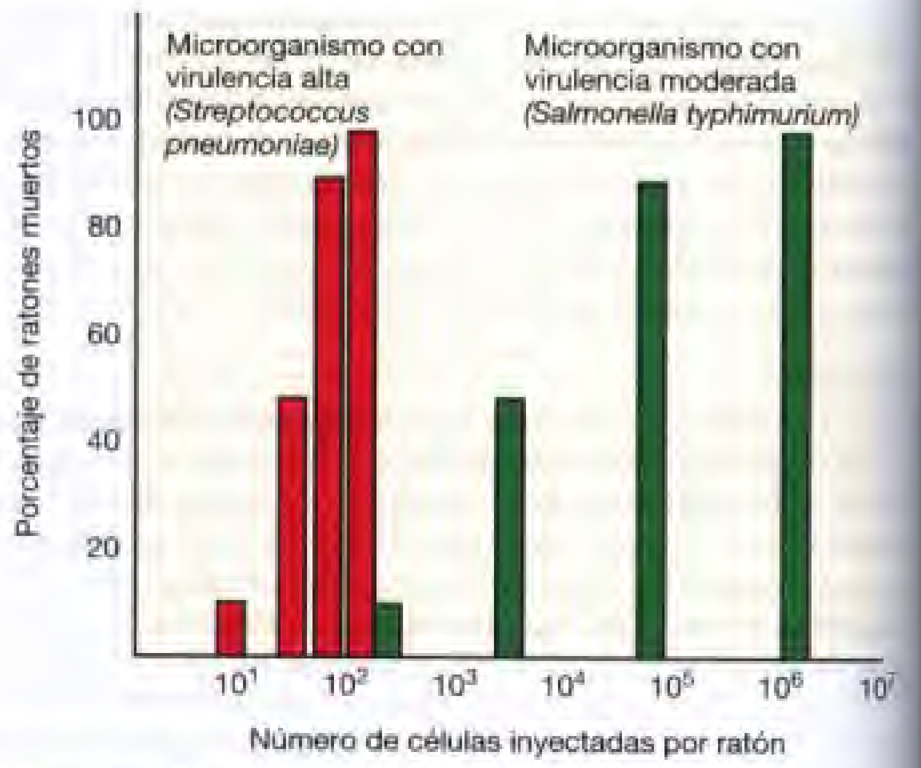


Figura 21.15 Comparación de difrenetes niveles de virulencia basasdo en número de células de *Streptococcus pneumoniae* y *Salmonella typhimurium*, requeridos para matar ratones.

Toxicidad e invasividad

La virulencia es la capacidad del patógeno de producir daño en el hospedador a través de la toxicidad y la capacidad de invasión. Cada patógeno utiliza estas propiedades para causar daño.

Toxicidad es la capacidad del patógeno de causar daño, debido a que secreta toxinas capaces de interaccionar con las funciones del hospedador o matar a las células. Por ejemplo, el tétano, causada por *Clostridium tetani* produce una potente exotoxina (*véase* Sección 21.10). Las céluas de *C. tetani* raramente salen de la herida donde fueron depositadas, creciendo de forma lenta, relativamente, en la herida. *C. tetani* produce una toxina que se mueve por el cuerpo, e inicia una contracción muscular que causa habitualmente la muerte del hospedador.

Invasividad es la capacidad del patógeno de crecer en los tejidos del hospedador en grandes cantidades, produciendo la inhibición de las funciones del hospedador. Un organismo puede producir invasividad y no producir toxina. Por ejemplo, el mayor factor de virulencia de *Stretococcus pnemoniae* es una cápsula de polisacárido que previene la fagocitosis (*véase* Sección 21.6, *véanse* Sección 22.2 y Figura 22.5), fallando la mejor defensa para prevenir la invasion. Las cepas encapsuladas de *S. pnemoniae* provocan daño al hospedador porque son altamente invasivas, crecen en el tejido pulmonar en grandes cantidades e inician la neumonía (*véase* Sección 26.2). Las cepas no encapsuladas son eliminadas por los fagocitos.

Clostridium tetani y *Stretococcus pnemoniae* ejemplifican los conceptos de virulencia e invasividad. La mayoría de los patógenos están en medio de los dos extremos y utilizan una combinación de virulencia y producción de toxinas para causar enfermedad.

Virulencia en *Salmonella*

Salmonella spp. emplea un cóctel de toxinas e invasividad y otros factores de virulencia para producir enfermedad. Varias toxinas contribuyen a la virulencia de *Salmonella* y, al menos, se producen tres toxinas: enterotoxina (Tabla 21.4), endotoxina (*véanse* Sección 4.9 y Figura 4.35) y *citoxina*. La citotoxina actúa inhibiendo la síntesis de proteína y permi-

TABLA 21.4 Exotoxinas y factores de virulencia extracelulares producidos por ciertas bacterias patógenas para el hombre

Organismo	Enfermedad	Toxina o factor	Acción
Bacillus anthracis	Carbunco	Factor letal (LF) Factor de edema (EF) Antígeno protector (PA y AB)	PA induce la unión del factor B, EF causa edema y LF causa muerte celular
Bacillus cereus	Intoxicación alimentaria	Enterotoxina (?)	Induce pérdida de líquidos del intestino
Bordetella pertussis	Tos ferina	Toxina pertusis (AB)	Bloque lel factor G de la traducción y mata células
Clostridium botulinum	Botulismo	Neurotoxina (AB)	Parálisis flácida (*véase* Figura 21.19)
Clostridium tetani	Tétano	Neurotoxina (AB)	Parálisis espástica (*véase* Figura 21.20)
Clostridium perfringens	Gangrena gaseosa, intoxicación alimentaria	α-toxina (CT)	Hemólisis (lecitinasa, *véase* Figura 21.17*b*)
		β-toxina (CT)	Hemólisis
		γ-toxina (CT)	Hemólisis
		δ-toxina (CT)	Hemólisis (cardiotoxina)
		κ-toxina (E)	Colagenasa
		λ-toxina (E)	Proteasa
		Enterotoxina (CT)	Altera la permeabilidad del epitelio intestinal
Corynebacterium diphtheriae	Difteria	Toxina diftérica (AB)	Inhibe la síntesis proteica en eucariotas (*véase* Figura 21.18)
Escherichia coli (sólo cepas enteropatógenas)	Gastroenteritis	Enterotoxina (AB)	Induce pérdida de líquidos del intestino
Pseudomonas aeruginosa	Diversas infecciones por *P. aeruginosa*	Exotoxina A (AB)	Inhibe la síntesis proteica
Salmonella spp.	Salmonelosis, fiebre tifoidea, y paratifoidea	Exotoxina (AB)	Inhibe la síntesis proteica y lisa células
		Cytotoxin (CT)	Induce pérdida de líquidos del intestino
Shigella dysenteriae	Disentería	Toxina Sigha (AB)	Inhibe la síntesis proteica bacteriana
Staphylococcus aureus	Infecciones piógenas (formadoras de pus) infecciones respiratorias, intoxicación alimentaria, síndrome de *shock* séptico, síndrome de piel escaldada	α-toxina (CT)	Hemólisis
		toxina síndrome de *shock* tóxico (SA)	*Shock* sistémico
		toxinas exfoliantesA y B (SA)	Descamación de la piel, *shock*
		Leucocidina (CT)	Destruye leucocitos
		β-toxina (CT)	Hemólisis
		γ-toxina (CT)	Mata células
		δ-toxina (CT)	Hemólisis, leucolisis
		Enterotoxinas A, B, C, D, y E (SA)	Inducen vómitos, diarrea, *shock*
		Coagulasa (E)	Induce coagulación de la fibrina
Streptococcus pyogenes	Infecciones piógenas, amigdalitis, escarlatina	Estreptolisina O (CT)	Hemólisis
		Estreptolisina S (CT)	Hemólisis (*véase* Figura 21.17)
		Toxina eritrogénica (SA)	Origina la erupción de la escarlatina
		Estreptoquinasa (E)	Disuelve los coágulos de fibrina
		Hialuronidasa (E)	Disuelve el ácido hialurónico en el tejido conectivo
Vibrio cholerae	Cólera	Enterotoxina (AB)	Induce pérdida de líquidos del intestino (*véase* Figura 21.21)

tiendo que el calcio escape de la célula del hospedador. Además, númerosos factores de virulencia están implicados en la invasion. Los factores de adhesión son un antígeno polisacárido O (Figura 4.35) y el antígeno flagelar H. Las fimbrias también pueden incrementar la adhesión. La cápsula Vi de polisacárido inhibe la unión del complemento y la muerte por anticuerpos (Sección 22.10). Los genes *inv* de *Salmonella* codifican para 10 proteínas diferentes inplicadas en invasión. Por ejemplo, *invH* codifica una adhesina de superficie, mientras que *invC*, *invG*, *invI* e *invJ* codifican proteínas implicadas en el ensamblado de los apéndices de la superficie, que son estructuras proteicas utilizadas para la unión a la célula hospedadora.

Salmonella da lugar a infecciones a través de parasitismo intracelular creciendo en el interior del intestino e, incluso, en los macrófagos, un grupo de células blancas de la sangre que fagocita y mata las bacterias (Sección 22.2). Los factores tóxicos del macrófago son neutralizados por las proteínas de *Salmonella*, el gen *oxyR*. Los macrófagos producen sustancias antibacterianas llamadas *defensinas*, que son neutralizadas por los productos de los genes *phoP* y *phoQ*. Por tanto, los productos de los genes *oxy* y *pho* permiten a *Salmonella* ser un patógeno intracelular, porque estos productos permiten el crecimineto intracelular. Algunos plásmidos de virulencia están implicados en la patogénesis de *Salmonella*. Finalmente, *Salmonella* también produce *sideróforos*, unas proteínas bacterianas que secuestran el hierro (*véanse* Sección 5.1 y Sección 21.7), un factor valioso de crecimiento. Por tanto, *Salmonella* y otros muchos patógenos utilizan determinados factores de virulencia para iniciar la enfermedad. En la Figura 21.16 se resume los factores de virulencia de *Salmonella*.

✓ 21.8 Revisión de conceptos

La virulencia es un factor determinante de la invasividad y toxigenicidad y otros factores producidos por los patógenos. En la mayoría de los patógenos, numerosos factores contribuyen a su virulencia. La atenuación es la pérdida de la virulencia.

- ✓ Distingua entre toxicidad e invasividad.
- ✓ Explique cómo un microorganismo puede ser atenuado. Discuta la atenuación para fabricar vacunas.

III FACTORES DE VIRULENCIA Y TOXINAS

Ciertas proteínas extracelulares y toxinas producidas por microorganismos contribuyen al establecimiento de la patogénesis. Una gran variedad de estas proteínas son producidas por numerosos patógenos, pero muchas de ellas tienen mecanismos de acción conservados y características moleculares similares. Aquí se mostrarán ejemplos representativos de factores de virulencia y toxinas.

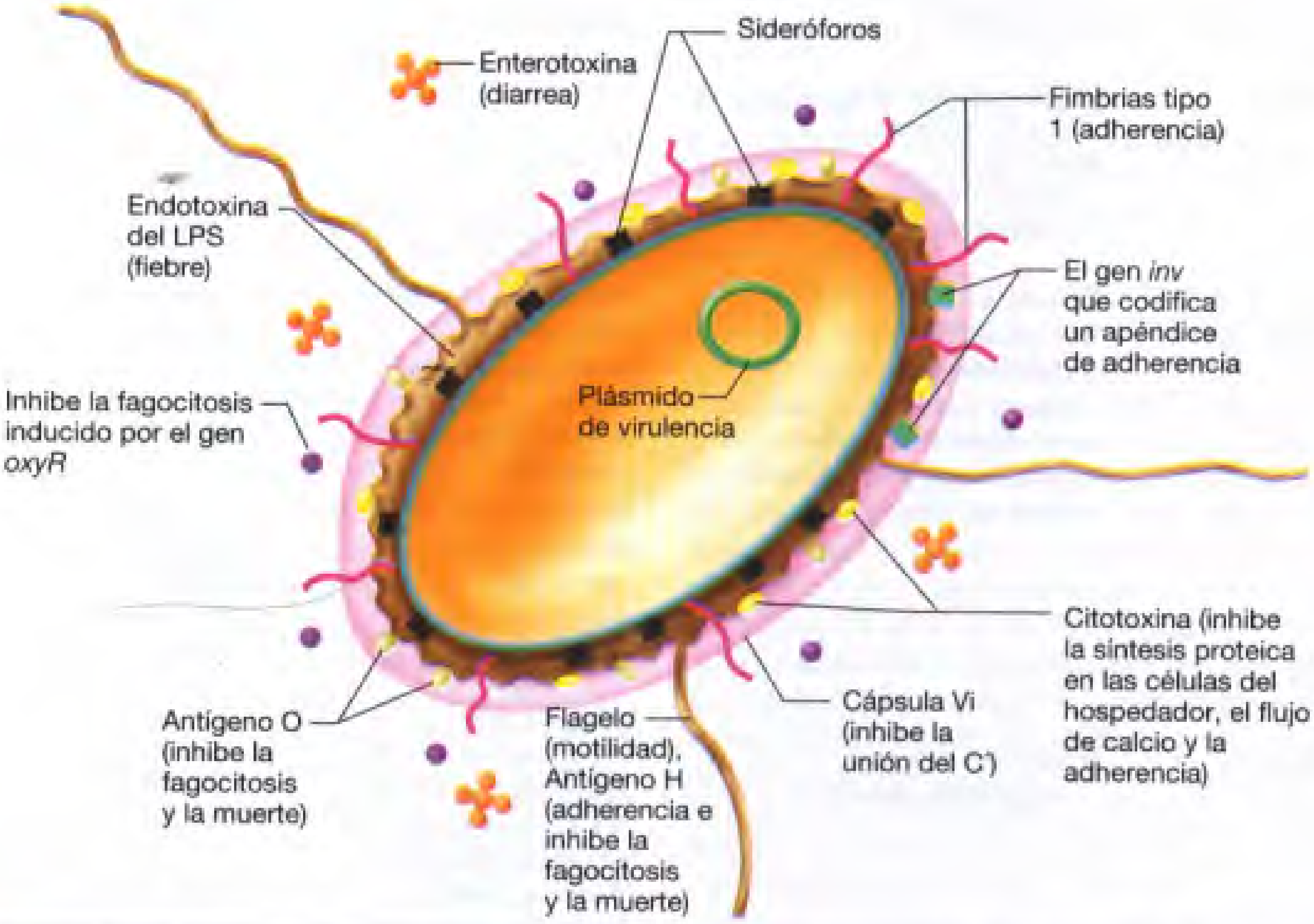

Sideróforos
Enterotoxina (diarrea)
Fimbrias tipo 1 (adherencia)
Endotoxina del LPS (fiebre)
El gen *inv* que codifica un apéndice de adherencia
Plásmido de virulencia
Inhibe la fagocitosis inducido por el gen *oxyR*
Citotoxina (inhibe la síntesis proteica en las células del hospedador, el flujo de calcio y la adherencia)
Cápsula Vi (inhibe la unión del C')
Antígeno O (inhibe la fagocitosis y la muerte)
Flagelo (motilidad), Antígeno H (adherencia e inhibe la fagocitosis y la muerte)

Figura 21.16 Resumen de los factores de virulencia que son importantes en la patogenia por *Salmonella*. Se muestran los elementos estructurales que son importantes para la virulencia. Los productos génicos del *pho* no han sido identificados, pero se sabe que neutralizan los efectos de los detergentes que producen los macrófagos (defensinas).

21.9 Factores de virulencia

Ciertas proteínas extracelulares producidas por patógenos contribuyen al establecimiento y mantenimiento de la enfermedad. Estas proteínas, la mayoría enzimas, se llaman *factores de virulencia*. Por ejemplo, los estreptococos, estafilococos, neumococos y algunos clostridios producen hialuronidasa (*véase* Tabla 21.4), una enzima que promueve la difusión de los organismos en los tejidos al romper el ácido hialurónico, un polisacárido que funciona como un cemento tisular. La producción de esta enzima permite que estos organismos se diseminen a partir del foco primitivo. Los estreptococos y estafilococos también producen un gran surtido de proteasas, nucleasas y lipasas que sirven para despolimerizar las proteínas del hospedador, los ácidos nucleicos y las grasas, respectivamente. Los clostridios causantes de la gangrena gaseosa producen colagenasa o toxina-k (*véase* Tabla 21.4), que escinde la red de colágeno que sustenta a los tejidos; la desagregación resultante del tejido es un factor que permite que estos organismos se dispersen por todo el cuerpo.

Fibrina, coágulos y virulencia

Frecuentemente, el hospedador genera coágulos de fibrina en una región invadida por microbios y rodea al microorganismo evitando así su difusión por el cuerpo, limitando la infección a una zona concreta de éste. Algunos organismos son capaces de producir enzimas fibrinolíticas para disolver estos coágulos e invadir más tejidos. Una de dichas sustancias fibrinolíticas, producida por *Streptococcus pyogenes*, se conoce como *estreptoquinasa* (*véase* Tabla 21.4).

Por otra parte, algunos organismos producen enzimas que *estimulan* la coagulación de la fibrina originando la localización del organismo más que su difusión. La enzima de esta clase mejor estudiada es la *coagulasa* (Tabla 21.4), producida por el patógeno *Staphylococcus aureus*, que hace que se deposite el material de fibrina sobre los cocos protegiéndoles del ataque de las células del hospedador. La matriz de fibrina formada como resultado de la actividad de la coagulasa podría explicar, probablemente, la localización de muchas infecciones estafilocócicas en diviesos y granos (*véase* Figura 26.23).

✓ 21.9 Revisión de conceptos

Los microorganismos producen gran variedad de enzimas diferentes que promueven la virulencia permitiendo la rotura o alterando las funciones del hospedador. Otros patógenos producen factores de virulencia que interfieren en los mecanismos de defensa del hospedador. Estos factores promueven la colonización y el crecimiento del patógeno.

- ✓ ¿Qué ventaja tiene un patógeno que produce enzimas que digieren los componentes estructurales del hospedador?
- ✓ ¿Cómo trabaja la acción de la coagulasa para ayudar o poner trabas en el crecimiento bacteriano? Dé ejemplos específicos.

21.10 Exotoxinas

Las toxinas que se liberan al medio extracelular a medida que crece el microorganismo se denominan **exotoxinas**. Estas toxinas pueden viajar desde un foco infectivo a zonas alejadas del cuerpo y producir daño en zonas muy distantes del lugar del crecimiento microbiano. La Tabla 21.4 resume las propiedades y las acciones de algunas de las exotoxinas más conocidas y otros factores de virulencia.

La mayoría de las exotoxinas se encuadran en tres categorías: las *toxinas citolíticas*, las *toxinas A-B* y los *superantígenos toxinas*. Las toxinas citolíticas trabajan enzimáticamente, atacando los componentes celulares y causando lisis. Las toxinas A-B son dos polipéptidos unidos covalentemente, A y B. El componente B generalmente se une a los receptores celulares, permitiendo que el componente A atraviese la membrana, donde funciona para provocar daño en la célula. Los superantígenos funcionan produciendo una gran estimulación de células inmunes, provocando una inflamación generalizada (*véase* Sección 22.14).

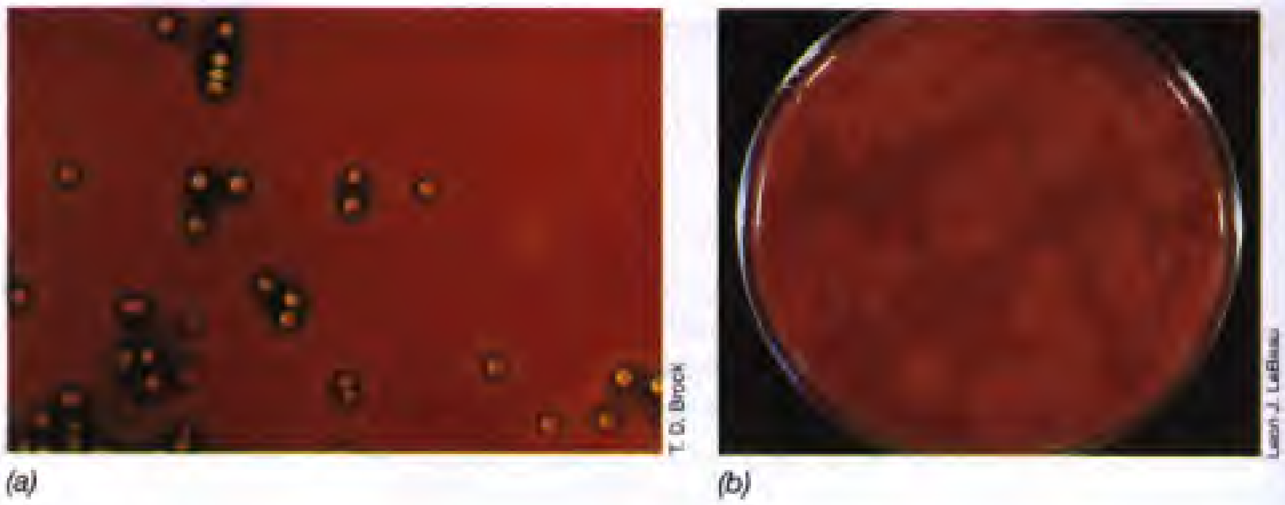
Toxinas citolíticas

Varios patógenos sintetizan proteínas que actúan en la membrana citoplasmática de la célula animal provocando la lisis celular y, consiguientemente, la muerte celular. Es muy fácil detectar la acción de estas toxinas con glóbulos rojos (eritrocitos o hematíes), de ahí que generalmente se denominen *hemolisinas* (Tabla 21.4); quizá, actúan también sobre otras células distintas a los eritrocitos. La producción de dichas toxinas es fácilmente demostrable en el laboratorio haciendo una siembra en estría del organismo en una *placa de agar sangre*. Durante el crecimiento de las colonias, se libera cierta cantidad de hemolisina produciéndose la lisis de los eritrocitos próximos, originando una zona clara típica de hemólisis (Figura 21.17*a*). Algunas hemolisinas son enzimas que atacan a los fosfolípidos de la membrana citoplasmática del hospedador. Debido a que el fosfolípido lecitina (fosfatidilcolina) se emplea a menudo como sustrato, estas enzimas se denominan *lecitinasas* o *fosfolipasas* (Figura 21.17*b*). Un ejemplo es la a-toxina de *Clostridium perfringens*, que es una lecitinasa que disuelve los lípidos de la membrana, provocando la lisis celular (Tabla 21.4). Puesto que las membranas citoplasmáticas de todos los organismos, tanto procariotas como eucariotas, contienen fosfolípidos, las hemolisinas que son fosfolipasas destruyen, en ocasiones, las membranas bacterianas así como las membranas citoplasmáticas animales. Sin embargo, algunas hemolisinas no son fosfolipasas. La estreptolisina O, una hemolisina producida por los estreptococos, afecta a los esteroles de la membrana citoplasmática del hospedador. Las *leucocidinas* (Tabla 21.4) son agentes líticos capaces de lisar leucocitos y de ahí que faciliten la disminución de la resistencia en el hospedador (*véase* Sección 22.1).

Toxina diftérica

La toxina producida por *Corynebacterium diphteriae*, el agente etiológico de la difteria es factor importante en la patogénesis de la difteria, discutida en Sección 26.3. Las ratas y ratones son relativamente resistentes, mientras que el

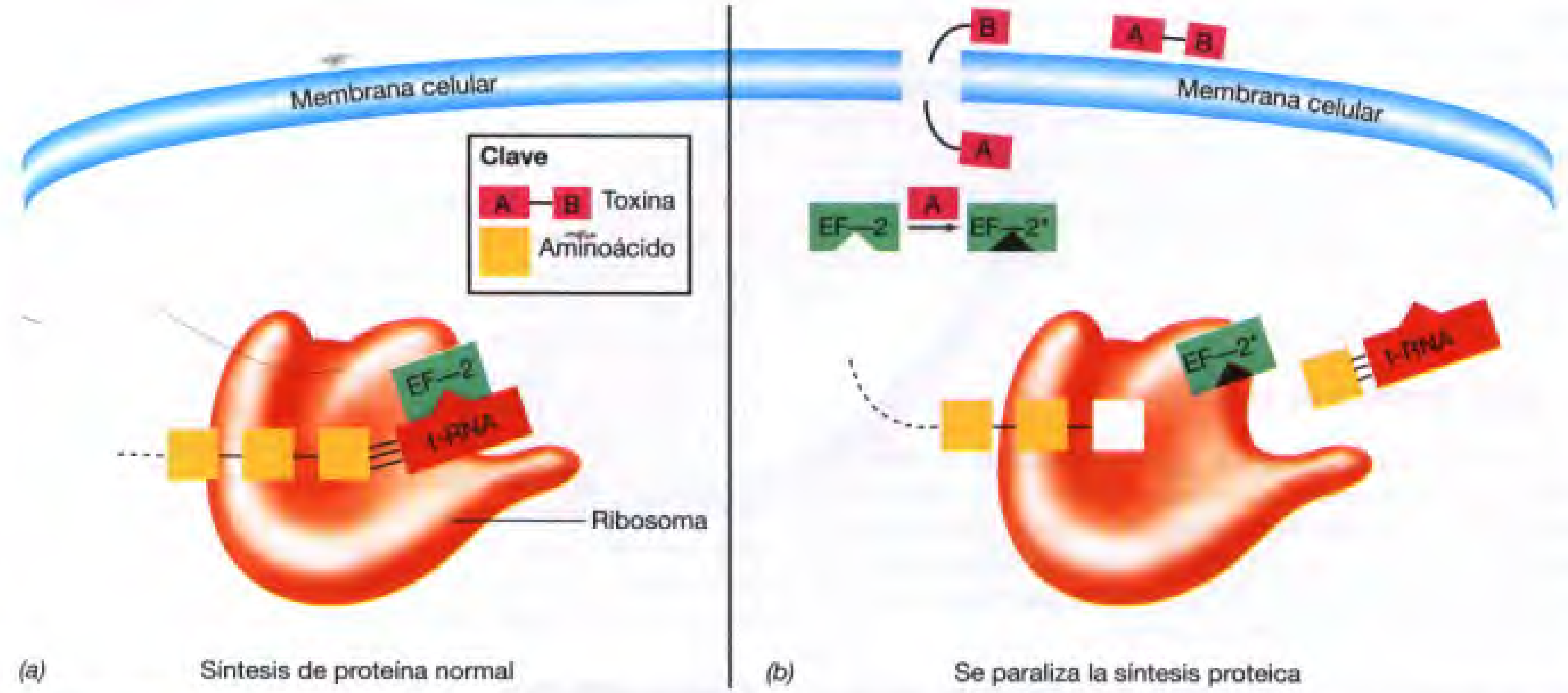
Figura 21.17 (a) Zonas de hemólisis alrededor de colonias de *Streptococcus pyogenes* creciendo en una placa de agar sangre. (b) Acción de la lecitinasa, una fosfolipasa, alrededor de colonias de *Clostridium perfringens*, creciendo en un medio de agar con yema de huevo, una fuente de lecitina. Lecitinasa disuelve la membrana de los glóbulos rojos, mostrando zonas claras.



hombre, los conejos, cobayos y pájaros son susceptibles. La toxina diftérica es muy potente; basta con una molécula para matar a una sola célula. La toxina A-B es secretada por las células de C. *diphteriae* como un polipéptido de 62 000 Dalton. El factor B se une irreversiblemente al receptor de la célula (Figura 21.18). Después de la unión, un corte proteolítico entre el fragmento A y B permite la entrada del fragmento A (21 000 Dalton) en el citoplasma celular. El fragmento A de la toxina interfiere con la síntesis proteica al bloquear el transporte de un aminoácido desde el ácido ribonucleico de transferencia (tRNA) a la cadena del péptido en crecimiento. La toxina inactiva específicamente a uno de los factores de elongación (factor de elongación 2) implicado en el crecimiento de la cadena polipeptídica al catalizar la fijación de la porción de la ribosa del difosfato de adenosina (ADP) del NAD$^+$ a la proteína naciente. Tras la ADP-ribosilación, la actividad del factor 2 de elongación cae estrepitosamente y cesa la síntesis de proteínas.

La toxina diftérica es producida por cepas de C. *diphteriae* que son lisogénicas para un bacteriófago llamado fago β, y la producción de toxina está codificada en el genoma del fago. Las cepas de C. *diphteriae* no toxigénicas y, por tanto, no patógenas, pueden transformarse en cepas patógenas por infección con el fago β (el proceso de conversión fágica) (*véase* Sección 10.7).

Un factor importante en la producción de toxina es la concentración de *hierro* presente en el ambiente. En los medios que contienen suficiente hierro para un crecimiento óptimo, no se produce toxina. La toxina se forma cuando la concentración de hierro se reduce a niveles limitantes para el crecimiento. El papel del hierro, en C. *diphteriae*, consiste en unirse a una proteína reguladora (esto es, actúa como un *elemento de control negativo*) (*véase* Sección 8.5). La proteína de unión al hierro se combina después con una región de control del DNA del fago β y evita la expresión del gen de la toxina diftérica. Cuando no existe hierro, la proteína reguladora no actúa y puede producirse la síntesis de la toxina.



(a) Síntesis de proteína normal

(b) Se paraliza la síntesis proteica

Figura 21.18 La acción de la toxina diftérica de *Corynebacterium diphterae*. (a) El factor 2 de elongación (EF-2), normalmente se une a la ribosa y transporta al aminoácido en el t-RNA al ribosoma, provocando la elongación de la proteína. (b) La toxina diftérica se une a la membrana, donde es hidrilizada, y el fragmento A es internalizado. El péptido A cataliza la ADP-ribosilación del factor 2 de elongación (EF-2*). El factor modificado no ayuda a la extensión de la cadena polipeptídica, como resultado se interrumpe la síntesis proteica y la célula muere.

Toxina Diftérica
TUTORIA

La exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 21.4) posee una acción bastante similar a la de la toxina diftérica, transfiriendo también la porción ADP-ribosil del NAD$^+$ al factor 2 de elongación.

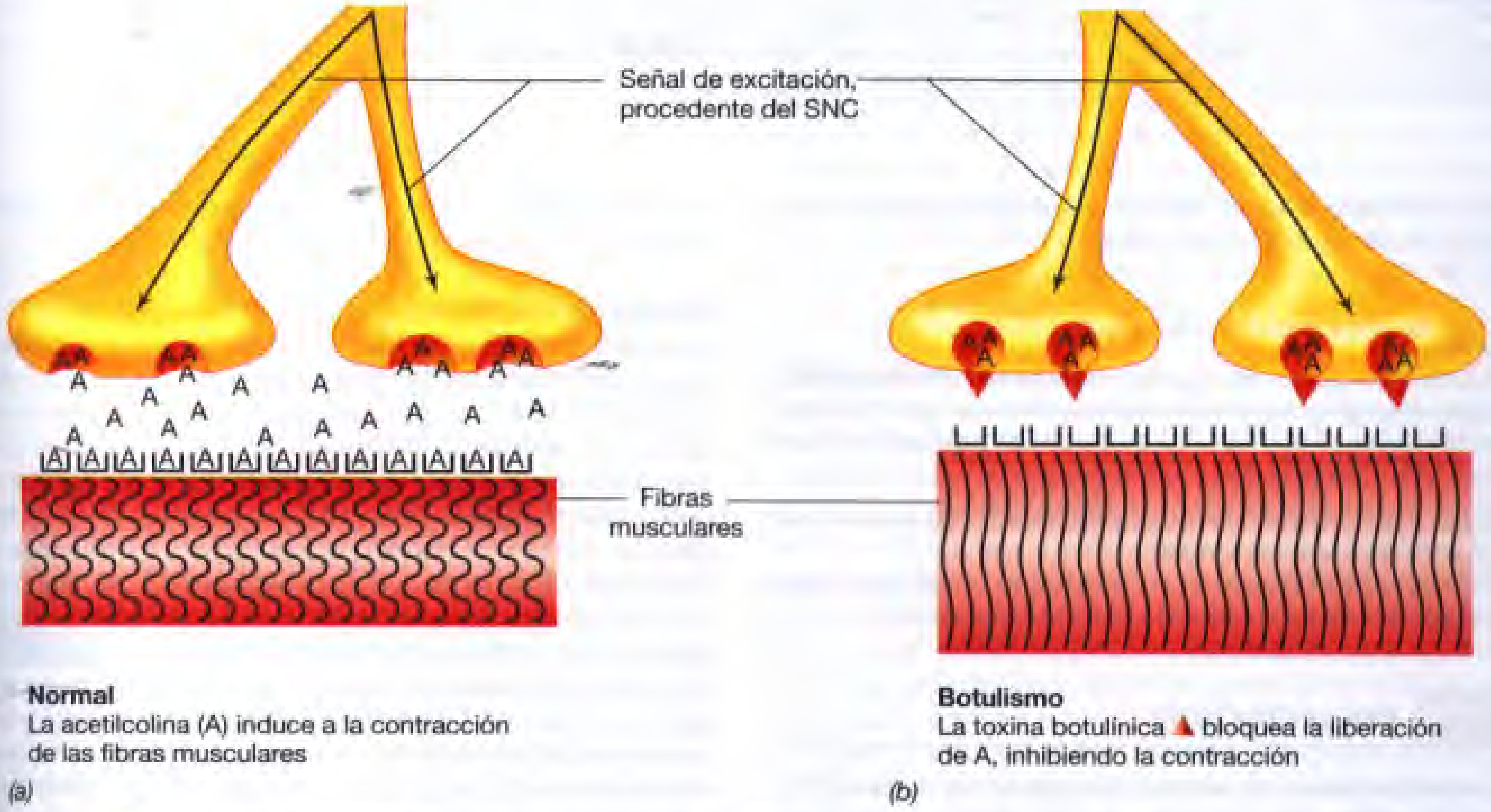
Toxinas del tétano y del botulismo

Estas toxinas son producidas por dos especies de bacterias anaerobias obligadas, *Clostridium tetani* y *Clostridium botulinum*, que son organismos habituales del suelo y ocasionalmente pueden producir enfermedad en los animales (*véanse* Secciones 27.8 y 29.5). Es raro que *C. botulinum* se multiplique directamente en el cuerpo, creciendo y produciendo, generalmente, su toxina en los alimentos en malas condiciones. La ingestión de alimentos que contienen la toxina origina una enfermedad neurológica y con frecuencia la muerte, producida por fallo respiratorio y parálisis del músculo flácido. *C. tetani* crece en heridas punzantes profundas que se convierten en anaerobias y, si bien *C. tetani* no invade el cuerpo a partir del foco inicial de la infección, la toxina que produce se puede difundir a través de las neuronas y provocar síntomas neurológicos graves (parálisis espástica) pudiendo provocar la muerte.

La *toxina botulínica* comprende una serie de A-B toxinas relacionadas que constituyen las sustancias más venenosas conocidas. Un miligramo de toxina botulínica pura es suficiente para matar a más de 1 millón de cobayas. De las siete toxinas diferentes descritas, al menos dos de ellas están codificadas por bacteriófagos lisogénicos específicos de *Clostridium botulinum*. La toxina principal es una proteína de aproximadamente 150.000 Dalton de peso molecular que forma fácilmente complejos con proteínas botulínicas no tóxicas, dando la forma activa de la toxina de aproximadamente 10^6 Dalton de peso molecular. La toxicidad se produce porque la toxina se fija a las membranas presinápticas en la unión neuromuscular, bloqueando la liberación de acetilcolina. Puesto que la transmisión del impulso nervioso al músculo se realiza mediante la acción de la acetilcolina, se inhibe la contracción muscular dando lugar a una parálisis flácida (Figura 21.19).

La *toxina tetánica* es una proteína de 150.000 Dalton de peso molecular que contiene dos polipéptidos A-B. Al penetrar en el sistema nervioso central, esta toxina se fija a las sinapsis nerviosas uniéndose específicamente a un lípido gangliósido. Esta unión bloquea la liberación de glicina, un factor que induce a la relajación de los músculos. En consecuencia, la toxina produce una constante activación de las neuronas motoras y una contracción persistente, músculos envenenados (Figura 21.20). El resultado es una parálisis espástica, convulsiva, con contracción de ambos músculos que se oponen entre sí al mismo tiempo. Si los músculos de la boca se ven afectados, el espasmo prolongado limita el movimiento de la boca dando lugar a un cuadro conocido como *trismo* o *mandíbula bloqueada*. Si se ven afectados los músculos respiratorios puede producirse la muerte por asfixia.

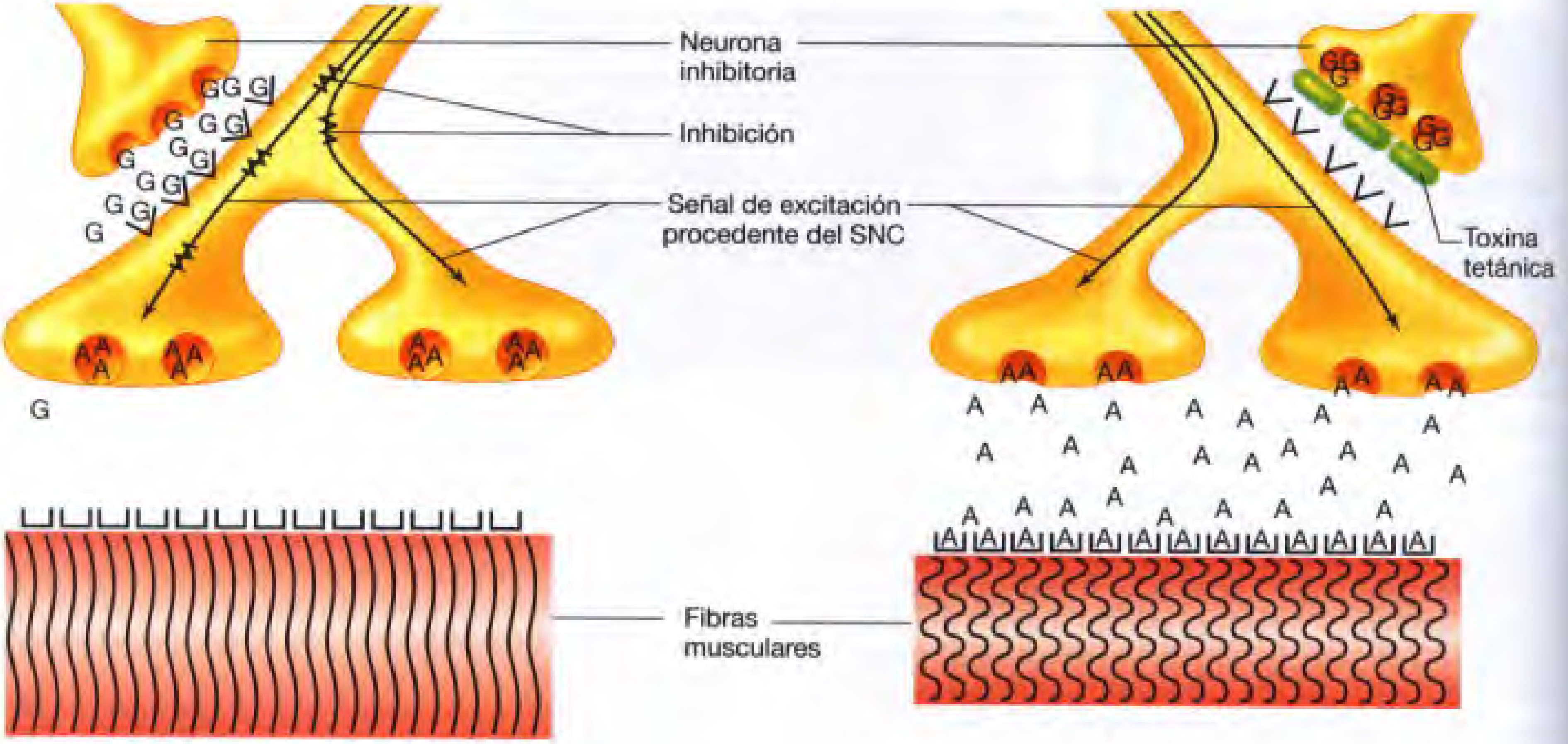
Las toxinas tetánica y botulínica bloquean la liberación de neurotransmisores implicadas en el control muscular,



Normal
La acetilcolina (A) induce a la contracción de las fibras musculares

Botulismo
La toxina botulínica ▲ bloquea la liberación de A, inhibiendo la contracción

Figura 21.19 La acción de la toxina de *Clostridium botulinum*. (a) Con una estimulación nerviosa la acetilcolina (A) es liberada de vesículas mediante el nervio motor. La acetilcolina se une a receptores específicos en el músculo, induciendo a la contracción. (b) La toxina botulínica actúa en la placa motora y previene la liberación de la acetilcolina (A) de las vesículas, provocando la falta de estímulo de las fibras musculares, la relajación irreversible de los músculos y una parálisis flácida (*véase* Sección 29.5).



Normal
La glicina (G) actúa en las neuronas motoras para bloquear la excitación y parar la liberación de acetilcolina (A), lo que permite la relajación del músculo

(a)

Tétano
La toxina tetánica bloquea la liberación de G y la relajación de las fibras musculares

(b)

Figura 21.20 La acción de la toxina tetánica de *Clostridium tetani.* (a) La glicina (G) induce la relajación muscular producida por neuronas inhibitorias. La glicina actua en las neuronas motoras para bloquear la excitación y liberar acetilcolina (A). La toxina tetánica bloquea la liberación de glicina, inhibiendo la relajación de las neuronas motoras. La liberación constante de acetilcolina provoca una contración irreversible de las fibras musculares y paralisis espástica (*véanse* Sección 27.8 y Figura 27.19).

pero el resultado es muy distinto, dependiendo del neurotransmisor afectado en particular.

✓ 21.10 Revisión de conceptos

Las toxinas biológicas más potentes son las exotoxinas producidas por los microorganismos. Toda exotoxina actúa en células o moléculas específicas del hospedador produciendo una disfunción.

- ✓ ¿Qué características clave comparten todas las exotoxinas? ¿Las de las exotoxinas A-B?
- ✓ ¿Es necesario que las bacterias crezcan en hospedador y que haya infección para que se produzcan las toxinas?

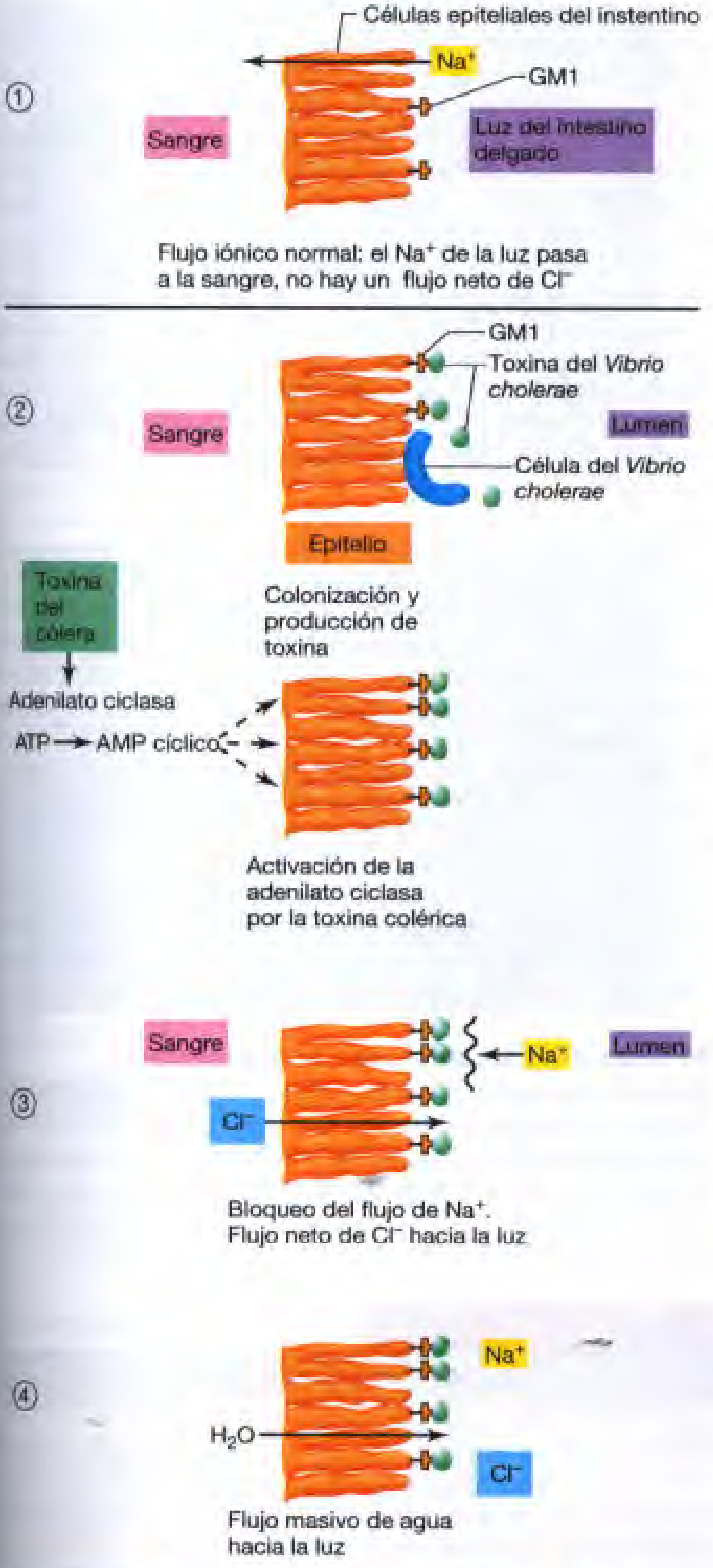
21.11 Enterotoxinas

Las **enterotoxinas** son exotoxinas que actúan sobre el intestino *delgado* causando habitualmente una secreción masiva de líquidos en la luz intestinal provocando vómitos y diarrea. Las enterotoxinas son producidas por distintas bacterias entre las que se incluyen los organismos de la intoxicación alimentaria *Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus*, y los patógenos intestinales *Vibrio cholerae, Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*.

Toxina del cólera

La enterotoxina producida por *Vibrio cholerae*, el agente etiológico del cólera, es la mejor conocida. La toxina colérica es una toxina A-B y está constituida por un componente A de peso molecular 27,200 y por cinco subunidades B, cada una de un peso molecular de 11,600 (el complejo tiene un peso molecular total de 82,000). La subunidad B contiene el sitio de unión a través del cual la toxina del cólera se combina específicamente con el gangliósido GM1 (un glicolípido complejo) en la membrana citoplasmática epitelial (Figura 21.21), pero la subunidad B por sí misma no causa una alteración en la permeabilidad de la membrana. Más bien, la acción tóxica corresponde a la cadena A que activa la enzima celular *adenilatociclasa*, causando la conversión del trifosfato de adenosina a monofosfato (ATP) de adenosina cíclico (cAMP).

Como se discutió en la Sección 8.7, el AMP cíclico es un mediador específico de varios sistemas reguladores en las células. En los mamíferos, el AMP cíclico está implicado en la acción de distintas hormonas así como en la transmisión



Flujo iónico normal: el Na^+ de la luz pasa a la sangre, no hay un flujo neto de Cl^-

Colonización y producción de toxina

Activación de la adenilato ciclasa por la toxina colérica

Bloqueo del flujo de Na^+. Flujo neto de Cl^- hacia la luz

Flujo masivo de agua hacia la luz

Figura 21.21 Acción de la enterotoxina del cólera. (1) El proceso normal del tráfico de iones en el intestino y la colonización de *Vibrio cholerae* siguiendo la liberación de la enterotoxina y la unión al gangliósido GM1 de las células del hospedador. (2) Las toxinas A-B actúan internalizando el componente A y activando la adenilato ciclasa. (3) Bloqueo del flujo normal de sodio (Na^+). (4) La pérdida de agua en el lumen y la diarrea. La terapia del cólera se basa en la reposición de iones y la hidratación. El tratamiento antibiótico puede acortar la enfermedad por limitar el crecimiento de los *V. cholerae*, pero no tiene efecto en la toxina ya liberada.

sináptica en el sistema nervioso, y en las reacciones inflamatorias e inmunes de los tejidos, incluyendo las alergias. Aunque la subunidad A de la toxina del cólera es responsable de la activación de la adenilatociclasa, en primer lugar A debe ser activada por una enzima celular que requiere NAD^+ y ATP. En el mecanismo de acción de la enterotoxina del cólera, el aumento de los niveles de AMP cíclico lleva consigo la secreción activa en la luz del intestino de iones cloruro y bicarbonato procedentes de las células mucosas que va al lumen del intestino. Este cambio en el equilibrio iónico origina la secreción de grandes cantidades de agua en el lumen del intestino (Figura 21.21). En la fase aguda del cólera, la intensidad de la pérdida acuosa en el intestino delgado es mayor que la reabsorción de agua por el intestino grueso, y de ahí que se produzca una pérdida masiva de líquidos. Las víctimas del cólera mueren generalmente por deshidratación extrema y el mejor tratamiento de la enfermedad es la administración oral de soluciones de electrolitos que contengan solutos para reemplazar los líquidos e iones perdidos.

Debido a que la enterotoxina del cólera activa la adenilatociclasa en distintas células y tejidos, las manifestaciones patológicas de la toxina del cólera están más relacionadas con el lugar específico al que se une, las células epiteliales del intestino delgado, que con la activación de la adenilatociclasa por la propia toxina. De hecho, subunidades B purificadas desprovistas de la actividad adenilciclasa pueden *evitar* la acción de la enterotoxina del cólera si se administran en primer lugar, debido a que se unen a los receptores específicos del cólera en las células de la mucosa y bloquean la unión de la toxina completa.

Los estudios de la toxina del cólera han demostrado que la enterotoxina colérica está codificada por dos genes, *ctxA* y *ctxB*. La expresión de *ctxA* y *ctxB* está controlada por un elemento regulador positivo, una proteína codificada por el gen *toxR*. El producto del gen *toxR* es una proteína transmembrana que controla no sólo la producción de la toxina del cólera sino también otros factores de virulencia importantes como las proteínas de la membrana externa y los pili que se necesitan para una colonización exitosa de *Vibrio cholerae* en el intestino delgado.

Otras enterotoxinas

Parece bastante evidente que las enterotoxinas producidas por *Escherichia* y *Salmonella* enteropatógenas presentan mecanismos de acción semejantes al de la toxina del cólera, y que algunos anticuerpos contra la enterotoxina colérica también inactivan a estas otras enterotoxinas, lo que sugiere una estructura similar. La secuencia de los genes de la toxina del cólera *ctxA*y *ctxB* apoya aún más esta relación: los genes de la toxina del cólera muestran más de un 75% de homología de secuencia con los genes que codifican la enterotoxina termolábil producida por *Escherichia coli* enteropatógena. Las enterotoxinas producidas por bacterias de la intoxicación alimentaria (*Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens, Bacillus cereus*) pueden ser bastante diferentes en sus mecanismos de acción. Por ejemplo, *Clostridium perfringens* es una citotoxina y *Staphylococcus aureus* es un superantígeno (Tabla 21.4). Los superantígenos tienen un modo de actuar completamente diferente, estimulando gran número de linfocitos y causando inflamación sistémica, además de inflamación intestinal (*véase* Sección 22.14).

✓ *21.11 Revisión de conceptos*

Las enterotoxinas son exotoxinas que actúan específicamente en el intestino delgado, produciendo cambios en la permeabilidad intestinal acompañados de diarrea. Muchos microorganismos responsables de la intoxicación alimentaria producen enterotoxinas.

- ✓ ¿Qué mecanismo clave comparten todas las enterotoxinas? ¿Y las A-B exotoxinas?
- ✓ Describa la acción de la toxina *Vibrio cholerae* en el intestino delgado. ¿Por qué provoca pérdida excesiva de fluidos?

21.12 Endotoxinas

Las bacterias Gram negativas producen lipopolisacáridos como parte de la capa externa de su pared celular (*véase* Sección 4.9), y bajo determinadas condiciones estos compuestos son tóxicos. Se denominan **endotoxinas** porque normalmente están unidas a la célula liberándose en grandes cantidades sólo cuando se lisan las células. En la mayoría de los casos, el término endotoxina puede equipararse al de lipopolisacárido. Las endotoxinas se han estudiado fundamentalmente en los géneros *Escherichia, Shigella* y especialmente *Salmonella*. Las diferencias principales entre exotoxinas y endotoxinas se indican en la Tabla 21.5.

Estructura y función de la endotoxina

Las endotoxinas, causan una variedad de efectos fisiológicos. El síntoma prácticamente universal es la *fiebre* puesto que la endotoxina estimula en las células del hospedador la liberación de proteínas llamadas *pirógenos endógenos*, que afectan al centro termo-regulador del cerebro. Además, puede desarrollar diarrea, experimentar una rápida disminución en el número de linfocitos, leucocitos y plaquetas, y entrar en un estado inflamatorio generalizado. Dosis altas de endotoxina pueden causar la muerte, principalmente a través de un *shock* hemorrágico y necrosis tisular. Sin embargo, la toxicidad de las endotoxinas es muy *inferior* a la de las exotoxinas. Por ejemplo, en el ratón la cantidad media de endotoxina necesaria para matar al 50% de una población de animales control (la denominada LD_{50}) es de 200-400 µg por ratón, mientras que la LD_{50} para la toxina botulínica es aproximadamente de 25 picogramos (pg) por ratón, ¡un millón de veces menos! (Un picogramo es 10^{-12} g o 10^{-6} µg).

La estructura general del lipopolisacárido (LPS) se representa gráficamente en la Figura 4.35. El lipopolisacárido consta del lípido A, un núcleo de polisacárido y que está formado por cetodesoxioctonato, azúcares de siete carbonos (heptosas), glucosa, galactosa y *N*-acetilglucosamina; y el *polisacárido O*, una molécula extraordinariamente variable que comúnmente contiene galactosa, glucosa, ramnosa y manosa, y generalmente está formada por uno o dos azúcares dideoxi raros como abecuosa, colitosa, paratosa o tivelosa. Los azúcares del *polisacárido O* están conectados en secuencias de cuatro a cinco azúcares (frecuentemente ramificados) que se repiten para formar la molécula completa (*véase* Sección 4.9). El lípido A no es un lípido de glicerol normal, sino que por el contrario los ácidos grasos están interconectados por un enlace éster a la *N*-acetilglucosamina. Los ácidos grasos que normalmente se hallan en el lípido incluyen los ácidos β-hidroximirístico, láurico, mirístico y palmítico. La purificación de las fracciones del lipopolisacárido ha demostrado que es el complejo del lípido A el responsable de la toxicidad y que la acción principal del polisacárido es hacer el lípido hidrosoluble e inmunógeno (*véase* Sección 22.3). Sin embargo, los estudios animales han demostrado que para lograr una respuesta se necesita el complejo endotóxico completo que contiene a la vez el polisacárido y el lípido.

Prueba del *Limulus* para la endotoxina

Dado que las endotoxinas son inductoras de la fiebre, los fármacos como antibióticos y soluciones intravenosas deben estar libres de endotoxinas. Se ha desarrollado una prueba para la detección de endotoxina de sensibilidad muy alta, utilizando lisados de amebocitos del cangrejo de herradura *Limulus polyphemus*. Aunque no se comprende el mecanismo

TABLA 21.5 Propiedades básicas de exotoxinas y endotoxinas

Propiedades	Exotoxinas	Endotoxinas
Propiedades químicas	Proteínas, excretadas por algunas bacterias Gram positivas o Gram negativas; generalmente termolábiles	Complejos lipopolisacárido-lipoproteína (*véase* Figura 4.35); liberadas tras la lisis celular, como parte de la membrana externa de bacterias Gram negativas, muy termoestables
Modo de acción; síntomas	Específico; generalmente se une a receptores específicos o a estructuras, citotoxina, enterotoxina o neurotoxina con acción específica sobre células o tejidos	General; fiebre, diarrea, vómitos
Toxicidad	Muy tóxicas, a menudo mortales	Débilmente tóxicas, raramente mortales
Inmunogenicidad	Muy inmunogénicas; estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes (antitoxinas)	Relativamente inmunógenos pobres; respuesta inmune insuficiente para neutralizar la toxina
Toxoide potencial	El tratamiento de la toxina con formaldehído elimina la toxicidad, pero la toxina tratada (toxoide) conserva la inmunogenicidad	Ninguno
Fiebre potencial	No producen fiebre en el hospedador	Pirógenas, producen con frecuencia fiebre en el hospedador

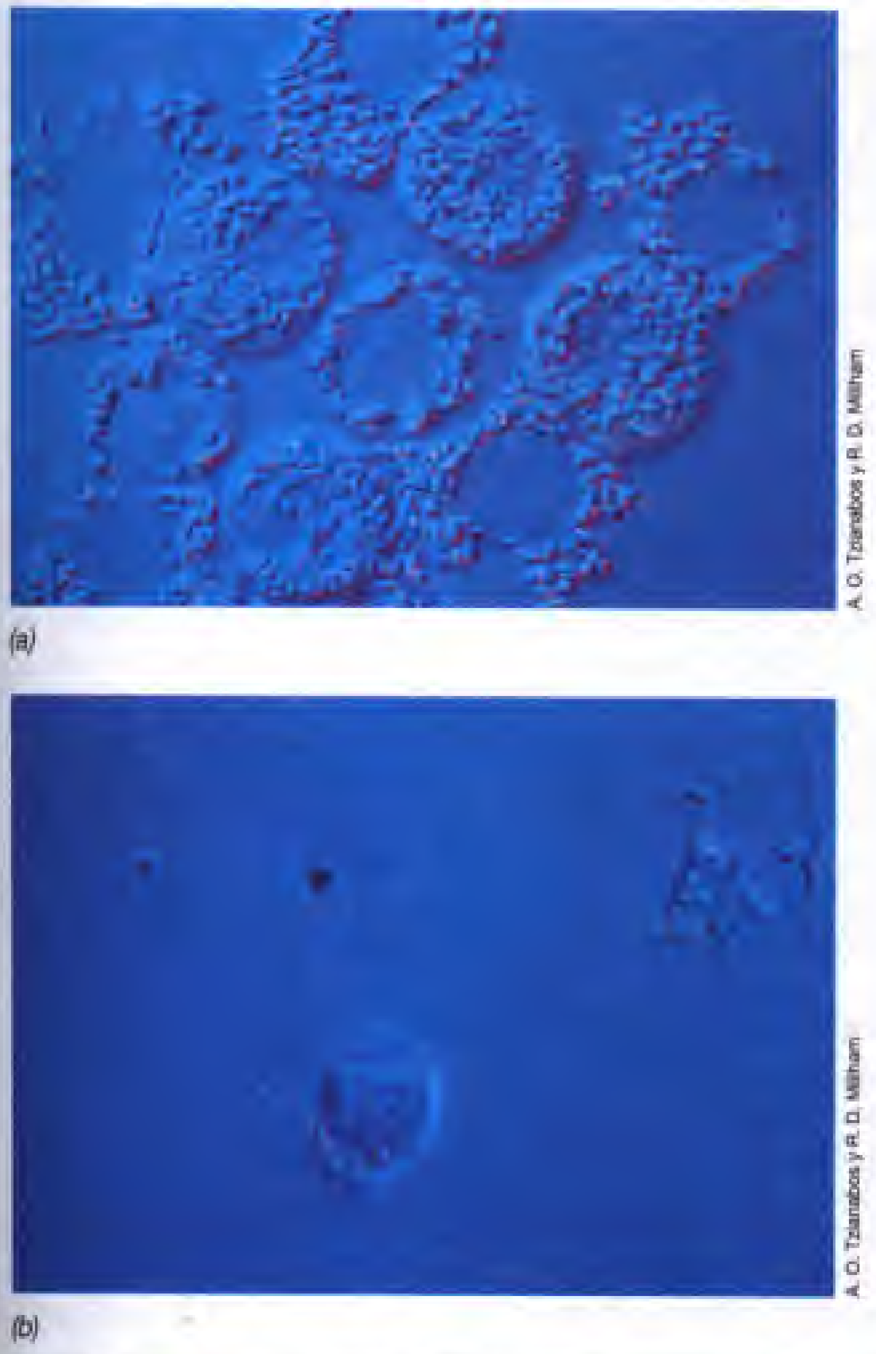

(a)
A. O. Tzianabos y R. D. Millham
(b)
A. O. Tzianabos y R. D. Millham

Figura 21.22 Micrografías de amebocitos del *Limulus*. (a) Amebocitos normales. (b) Amebocitos tras la exposición al lipopolisacárido bacteriano. El tratamiento con lipopolisacárido provoca la degranulación de las células y puede emplearse esta reacción como una prueba del contenido en lipopolisacárido.

de esta prueba, la endotoxina provoca la lisis específica de los amebocitos (Figura 21.22). En un test comercial (kit), se mezclan extractos de amebocitos con la solución que se va a ensayar. Si la endotoxina está presente, el extracto de amebocitos gelifica y precipita, causando un cambio perceptible en la turbidez. Esta reacción puede cuantificarse con un espectrofotómetro y la reacción puede medirse con cantidades tan pequeñas como 10 pg/ml de polisacárido. Se ha utilizado la prueba del *Limulus* para la detección de la presencia de cantidades minúsculas de endotoxina en el suero, líquido cefalorraquídeo, agua para beber y soluciones inyectables.

La prueba del *Limulus* es muy sensible por lo que debe ponerse especial cuidado para evitar la contaminación del equipo, soluciones y reactivos con bacterias Gram negativas del laboratorio y del entorno clínico, por ejemplo, como contaminantes del agua destilada. En la rutina clínica, la detección de endotoxina en suero o líquido cefalorraquídeo mediante la prueba del *Limulus* constituye un diagnóstico presuntivo de infección por Gram negativas de estos líquidos corporales.

✓ 21.12 Revisión de concepto

Las endotoxinas son componentes tóxicos de la pared celular externa que derivan de las bacterias Gram negativas. Liberándose en grandes cantidades sólo cuando se lisan las células, la fiebre en el hospedador es un síntoma de la acción de la endotoxina y otros efectos tóxicos en el hospedador. Las endotoxinas son normalmente menos tóxicas que las exotoxinas.

- ✓ ¿Por qué las bacterias Gram positivas no producen endotoxinas?
- ✓ ¿Por qué es necesario testar las preparaciones de drogas para las endotoxinas?

IV DEFENSAS INESPECÍFICAS DEL HOSPEDADOR

Muchos de los mecanismos responsables de la eliminación de los patógenos son «factores de resistencia» innatos. Estos factores de resistencia pueden dividirse en dos categorías: defensas del hospedador *específicas*, que están dirigidas a las especies o cepas individuales de los patógenos, y defensas *inespecíficas* del hospedador, dirigidas a distintos patógenos. En este capítulo consideraremos las principales defensas *inespecíficas* del hospedador que son importantes para conservar la salud de éste. En el capítulo siguiente abordaremos las defensas del hospedador *específicas* de éste, responsables de la *respuesta inmune*.

21.13 Resistencia no específica a la infección

La primera línea de defensa frente a los patógenos está compuesta de mecanismos físicos y químicos que poseen especies animales que actúan de forma no específica para evitar la invasión por patógenos. Este mecanismo, generalmente, evita a los patógenos causar enfermedad.

Resistencia natural del hospedador

La habilidad de un determinado patógeno de causar enferemedad en una animal es muy variable. En la *rabia*, por ejemplo, generalmente se produce la muerte en todas las especies de mamíferos una vez que se desarrollan los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, ciertas especies animales son mucho más susceptibles a la rabia que otras. Los mapaches y las mofetas, por ejemplo, son muy susceptibles a la rabia si se compara con las zarigüeyas que raramente se relacionan con casos de rabia en animales salvajes. El microorganismo productor del *carbunco** (*Bacillus anthracis*) infecta a varios animales y produce síntomas clínicos que varían desde pústulas en el hombre, hasta una intoxicación sanguínea mortal en el ganado vacuno. Sin embargo, el carbunco *pulmonar* es fatal en humanos (*véase* Sección 25.11). No obstante, las aves son totalmente resistentes al carbunco. Por último, es raro que las enfermedades de los animales de sangre caliente se transmitan a las especies de sangre fría, y viceversa.

---

* N. del T.: En el texto original se hace referencia simultáneamente a los síntomas de la infección producida tanto por *Staphylococcus aureus* (*ántrax*) como por *Bacillus anthracis* (*carbunco*), bajo la misma denominación inglesa de *anthrax*.

El resultado final meridiano es que las distintas especies animales, incluso si están muy próximas, pueden presentar susceptibilidades completamente diferentes hacia el mismo patógeno.

Edad, estrés y dieta

La *edad* es un factor importante en la susceptibilidad a la enfermedad infecciosa. Las enfermedades infecciosas son más comunes en la gente muy joven y en los mayores. En el niño, por ejemplo, el desarrollo de una biota normal (microbiota) intestinal ocurre con bastante rapidez, pero la biota normal (microbiota) de un niño no es la misma que la del adulto. Antes del desarrollo de la biota (microbiota) del adulto, y especialmente en los días inmediatamente posteriores al nacimiento, los patógenos tienen el terreno abonado para establecerse y producir una enfermedad. De ahí que la diarrea causada por cepas de *Escherichia coli* enteropatógena (*véase* Sección 29.7) o de *Pseudomonas aeruginosa* se encuentra a menudo en los niños menores de 1 año. El botulismo infantil se observa sólo en niños muy jóvenes debido a que el desarrollo de la biota (microbiota) intestinal normal en los niños mayores evita la infección intestinal con *Clostridium botulinum* que causa la enfermedad (*véase* Sección 29.5).

En individuos por encima de los 65 años, las enfermedades infeciosas son mucho más frecuentes que en los adultos jóvenes. Por ejemplo, las personas mayores son mucho más susceptibles a las infecciones respiratorias, concretamente a la gripe (*véase* Sección 26.8), lo que probablemente se deba a una menor capacidad para orquestar una respuesta inmune eficaz contra los patógenos respiratorios. Además, los cambios anatómicos que se asocian al envejecimiento también pueden favorecer la infección. El aumento de tamaño de la próstata, una circunstancia habitual en los varones a partir de los 50 años, conduce habitualmente a la disminución de la micción. A su vez, esta situación permite a los patógenos colonizar más rápidamente el tracto urinario masculino, (Figura 21.11) lo que trae consigo un aumento de estas infecciones en los varones mayores.

El *estrés* puede predisponer a la enfermedad en las personas normalmente sanas.

Por ejemplo, las ratas sometidas a una intensa actividad física durante largos periodos de tiempo, muestran una tasa de mortalidad más elevada a las infecciones experimentales con *Salmonella* que los animales control en situación basal. La interacción de las hormonas, que son producidas bajo condiciones de estrés, con el sistema inmune puede jugar un papel en la enfermedad mediada por el estrés. Los equilibrios hormonales cambian drásticamente cuando se coloca a un animal en condiciones estresantes. La hormona *cortisona*, por ejemplo, en momentos de estrés alcanza niveles mucho más altos que durante los periodos de calma, siendo esta hormona un agente antiinflamatorio eficaz. La supresión de la inflamación elimina una de las defensas normales contra la enfermedad (*véase* Sección 21.14).

La *dieta* juega un papel en la defensa del hospedador. Desde hace siglos se conoce la correlación entre hambre y enfermedad infecciosa. Los déficit proteicos pueden alterar la composición de la biota normal (microbiota) permitiendo de este modo que los patógenos oportunistas puedan multiplicarse. Por ejemplo, el cólera es mucho más frecuente en individuos malnutridos que en los bien nutridos. El número de *Vibrio cholerae* que se requiere para provocar infección disminuye significativamente cuando se ingiere *V. cholerae* con los alimentos; esto se debe presumiblemente a que los alimentos neutralizan los ácidos del estómago que normalmente destruirían al patógeno (*véase* Sección 28.5).

La exclusión en la alimentación de una sustancia necesaria para un patógeno puede servir como medida *preventiva* de la enfermedad. En este caso, el mejor ejemplo es el efecto de la sacarosa sobre el desarrollo de la caries dental. Como se explicó en la Sección 21.3, la ausencia de sacarosa en la dieta (junto con una buena higiene bucal) elimina virtualmente el deterioro de los dientes. En ausencia de sacarosa, las bacterias *Streptococcus mutants* y *S. sobrinus* que son muy cariogénicas, son incapaces de sintetizar el polisacárido pegajoso de la superficie externa que se necesita para mantener unidas las células bacterianas al diente.

Defensas físicas y químicas

La integridad estructural de las superficies tisulares supone una barrera a la penetración por los microorganismos. En la piel y los tejidos mucosos, los patógenos potenciales no sólo deben unirse a las superficies de los tejidos sino también crecer en estos lugares antes de diseminarse a cualquier parte del cuerpo. Las superficies intactas forman una barrera eficaz a la colonización, pero es más fácil que los

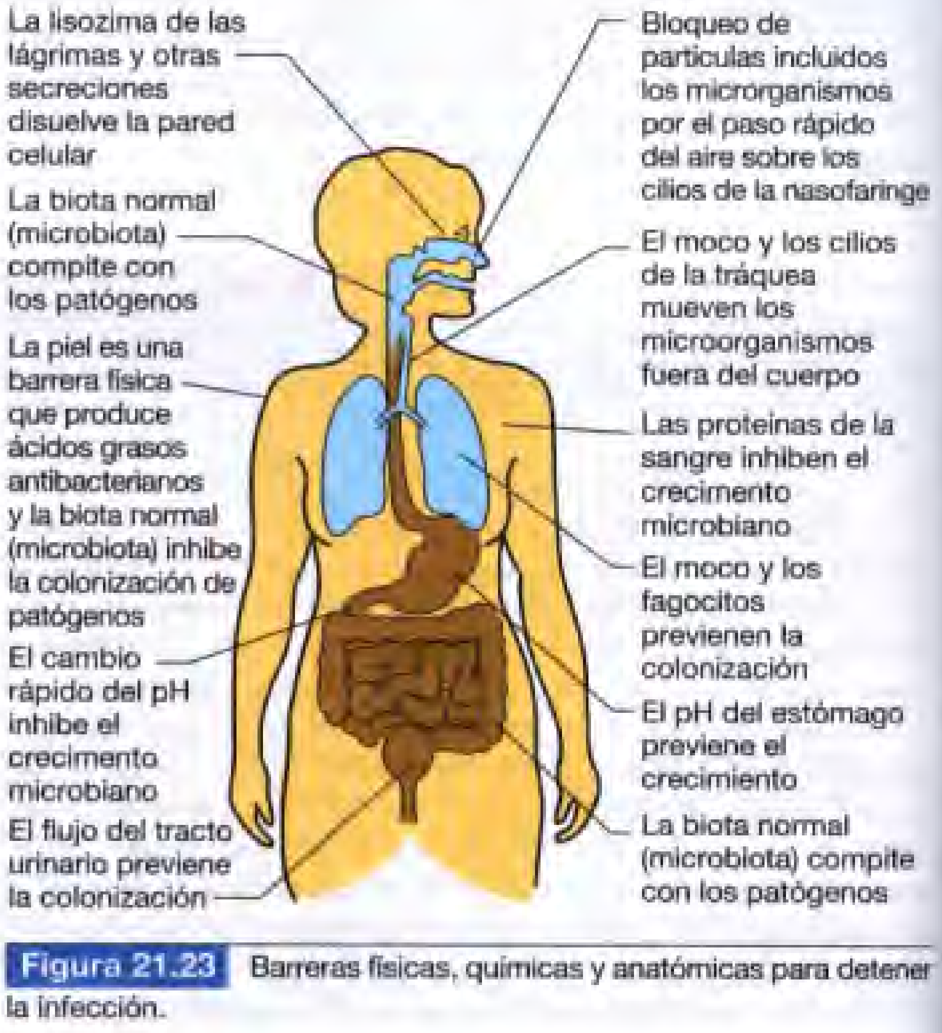

La lisozima de las lágrimas y otras secreciones disuelve la pared celular
La biota normal (microbiota) compite con los patógenos
La piel es una barrera física que produce ácidos grasos antibacterianos y la biota normal (microbiota) inhibe la colonización de patógenos
El cambio rápido del pH inhibe el crecimento microbiano
El flujo del tracto urinario previene la colonización
Bloqueo de partículas incluidos los microrganismos por el paso rápido del aire sobre los cilios de la nasofaringe
El moco y los cilios de la tráquea mueven los microorganismos fuera del cuerpo
Las proteínas de la sangre inhiben el crecimento microbiano
El moco y los fagocitos previenen la colonización
El pH del estómago previene el crecimiento
La biota normal (microbiota) compite con los patógenos

Figura 21.23 Barreras físicas, químicas y anatómicas para detener la infección.

microbios logren acceder a las superficies lesionadas (por ejemplo en la piel desgastada). La resistencia a la colonización e invasión se debe a la producción de sustancias defensivas en el hospedador y a distintas acciones mecánicas que alteran la colonización. En la Figura 21.23, se resumen las principales defensas anatómicas.

La *piel* es una barrera eficaz a la penetración de los microorganismos. Las *glándulas sebáceas* de la piel (Figura 21.2) secretan ácidos grasos y ácido láctico que disminuye el pH de la piel e inhibe la colonización de bacterias patógenas. Los microorganismos inhalados a través de la *nariz* o de la *boca* son eliminados por la acción de las células epiteliales ciliadas en las superficies mucosas de la nasofaringe y la tráquea. Los cilios empujan las células bacterianas hacia el exterior hasta que son atrapadas en las secreciones bucales siendo expectoradas o ingeridas y destruidas en el estómago. Los patógenos potenciales que penetran en el estómago deben, en primer lugar, sobrevivir a su *acidez* (un pH 2, aproximadamente) y después competir con éxito con la biota (microbiota) residente, en progresivo aumento en el intestino delgado (con un pH 5, aproximadamente) y finalmente en el intestino grueso (pH 6-7). Este último órgano contiene, en un adulto normal, cerca de 10^{10} bacterias por gramo de contenido intestinal (*véase* Sección 21.4), haciendo el establecimiento de microorganismos muy difícil.

En un adulto sano, la piel y la superficie del ojo están bañadas continuamente por secreciones que contienen *lisozima* que reduce notablemente las poblaciones microbianas. Los líquidos extracelulares como el plasma sanguíneo también contienen sustancias bactericidas. Por ejemplo, las proteínas de la sangre llamadas β-lisinas se unen y destruyen las células microbianas.

Especificidad de tejido

En principio, la mayoría de los patógenos debe colonizar el lugar de la infección. Si dicho lugar no es compatible con sus requerimientos nutricionales y ambientales, los organismos no pueden multiplicarse. Por tanto, si se ingiere *Clostridium tetani*, no se produciría tétanos porque el patógeno es destruido por la acidez gástrica. Por otro lado, si las células del *C. tetani* llegan a una herida profunda, el organismo crecería en zonas anaerobias originadas por la destrucción localizada del tejido y se formaría la toxina tetánica (*véase* Secciónes 21.10 y 27.8). En contraposición, las bacterias entéricas como *Salmonella* y *Shigella* no causan infecciones de heridas pero colonizan con éxito el tracto intestinal. La Tabla 21.6 resume numerosos ejemplos de especificidad tisular.

El hospedador comprometido

El término *hospedador comprometido* se refiere a aquellos hospedadores en los que funcionan mal uno o más mecanismos de resistencia y en los que, por tanto, existe mayor probabilidad de infección.

Los pacientes hospitalizados con enfermedades no infecciosas (por ejemplo, cáncer y enfermedades del corazón) ordinariamente adquieren infecciones y son hospedadores comprometidos (*véase* Sección 25.7). Muchas de las técnicas hospitalarias como cateterismo, inyección hipodérmica, punción espinal y biopsia, pueden introducir también patógenos en el enfermo. El estrés de la cirugía disminuye igualmente la resistencia del paciente a la infección. Las drogas antiinflamatorias reduce el dolor y la inflamación, pero también reducenn la resistencia del hospedador (*véase* Sección 21.13). Por último, en las técnicas del trasplante de órganos, se utilizan fármacos que suprimen el sistema inmune con objeto de prevenir el rechazo del trasplante, los fármacos inmunosupresores aumentan enormemente la susceptibilidad a la infección.

Existen hospedadores comprometidos incluso fuera del hospital. El hábito de fumar, el consumo excesivo de alcohol, el uso de drogas por vía intravenosa, la falta de sueño, la nutrición inadecuada y la propia infección son situaciones que comprometen a un hospedador. Por ejemplo, el virus causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) destruye un tipo de células implicado en la respuesta inmune (las células T cooperadoras) (*véase* Sección 22.7). Por tanto, los enfermos con SIDA son incapaces de orquestar una resistencia eficaz a la infección; la muerte se debe generalmente a algún agente infeccioso (*véase* Secciones 25.6 y 25.14).

Finalmente, existen determinadas condiciones genéticas que pueden comprometer al hospedador, como las enfermedades genéticas que eliminan partes importantes del sistema inmune. Los individuos con estas afecciones mueren habitualmente a edad temprana debido a la infección más que a la propia predisposición genética.

TABLA 21.6 Especificidad de tejido como un factor en la enfermedad infecciosa

Enfermedad	Tejido infectado	Organismo
Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)	Linfocitos T cooperadores	Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)
Botulismo	Placa motora	*Clostridium botulinum*
Cólera	Epitelio del intestino delgado	*Vibrio cholerae*
Caries dental	Epitelio bucal	*Streptococcus mutans, S. sobrinus, S. sanguis, S. mitis*
Difteria	Epitelio faringeo	*Corynebacterium diphtheriae*
Gonorrea	Epitelio urogenital	*Neisseria gonorrhoeae*
Malaria	Sangre (eritrocitos)	*Plasmodium* sp.
Pielonefritis	Médula renal	*Proteus* sp.
Aborto espontáneo (vacas)	Placenta	*Brucella abortus*
Tétanos	Inhibición interneuronal	*Clostridium tetani*

✓ 21.13 Revisión de conceptos

Las barreras físicas, anatómicas y químicas impiden la colonización del hospedador por la mayoría de los patógenos. La rotura de estas defensas compromete al hospedador que es más susceptible a la infección.

✓ ¿Cómo puede influir la dieta y el fumar en la resistencia del hospedador a un patógeno?
✓ ¿Cómo comprometería la existencia de una infección previa a un hospedador, por lo demás sano?

21.14 Inflamación y fiebre

La **inflamación** es una reacción general inespecífica a partículas extrañas y a otros estímulos perjudiciales como toxinas y patógenos. La respuesta inflamatoria da lugar típicamente a eritema, hinchazón, dolor y calor, que se localizan en el lugar donde el hospedador contactó con los estímulos nocivos. Los mediadores de la inflamación incluyen un grupo de proteínas denominadas *citocinas* (Sección 23.10), que son producidas por las células blancas de la sangre o **leucocitos** (Sección 22.1). Los leucocitos están también involucrados en las respuestas específicas del patógeno a estímulos nocivos en la respuesta inmune, que expondremos en el Capítulo 22. El resultado más importante de la respuesta inflamatoria es la localización inmediata del agente dañino, frecuentemente a través de la producción de un coágulo de fibrina en el foco inflamatorio.

La inflamación es uno de los aspectos más importantes de la defensa del hospedador contra los microorganismos invasores. Sin embargo, la inflamación es también un aspecto relevante de la patogenia microbiana, porque la respuesta inflamatoria desencadenada por un microorganismo invasor puede ir seguida de un considerable daño para el hospedador, haciendo los nutrientes disponibles y provomiendo el acceso a otros tejidos.

Pueden producirse también respuestas inflamatorias sistématicas incontroladas. La inflamación sistémica se denomina *choque séptico* y causa una inflamación generalizada, como el edema severo y fiebre incontrolada. El choque séptido puede ser mortal, y se produce cuando la inflamación y la infección se desarrollan en todo el cuerpo, via linfática o circulatoria (Sección 22.1).

Fiebre

El cuerpo humano sano mantiene una temperatura sorprendentemente constante. En un periodo promedio de unas 24 horas, la temperatura corporal fluctúa en el estrecho margen de 1-1,5°C. Sin embargo, la temperatura fisiológica de los individuos varía y aunque se considera el estándar normal de temperatura 37°C, la verdadera temperatura normal en algunos individuos puede ser tan baja como 36°C o tan alta como 38°C. Además, la temperatura corporal cambia con la intensidad de la actividad física y puede estar hasta 2°C por debajo de lo normal en el sueño y hasta 4°C por encima de lo normal durante el ejercicio intenso.

La **fiebre** se define como un aumento *anormal* de la temperatura corporal. Aunque la fiebre puede estar causada por una enfermedad no infecciosa, la mayoría de las fiebres obedecen a una infección. Existe, al menos, una razón que explique la aparición de fiebre durante muchas infecciones y es que ciertos productos de los organismos patógenos son *pirógenos* (productores de fiebre). Los agentes pirógenos mejor estudiados son las endotoxinas de las bacterias Gram negativas (*véase* Sección 21.12). Sin embargo, muchos organismos que no producen endotoxinas son capaces de producir fiebre tras la infección. En estos organismos, una vez que son destruidos por los leucocitos, se liberan unas proteínas denominadas *pirógenos endógenos* (Sección 22.2). Un ligero aumento de la temperatura beneficia al hospedador acelerando las respuestas fagocíticas y de anticuerpos, mientras que fiebres de 40°C (104°F) o superiores pueden ser beneficiosas para el patógeno, si los tejidos del hospedador son dañados por la elevación de la temperatura.

Se han descrito tres clases de patrones de fiebre característicos de la enfermedad infecciosa. (1) La *fiebre continua* se caracteriza porque la temperatura corporal se mantiene elevada durante unas 24 horas y el margen total de variación térmica es inferior a 1°C. Se ve fiebre continua en la *fiebre tifoidea* (Sección 28.8) y en la *fiebre del tifus* (Sección 27.3). (2) Una *fiebre remitente* es aquella en la que la temperatura corporal es anormal durante un periodo completo de 24 horas y el rango diario muestra variaciones mayores a 1°C. Esto ocurre en algunas *infecciones piógenas* (Secciones 26.2 y 26.9) y en la *tuberculosis* (Sección 26.5). (3) Una *fiebre intermitente* es aquella en la que la temperatura es normal durante parte del día y después se eleva por encima de lo normal. La mayoría de las enfermedades infecciosas provocan fiebre intermitente y esta situación es un diagnóstico característico de la malaria (Sección 27.5), una infección debida a un protozoo. La *fiebre recurrente*, causada por varias especies de *Borrelia* (Secciones 27.3), es una fiebre intermitente en la que la temperatura se mantiene normal durante un largo lapso de tiempo, seguido por un nuevo brote de fiebre. Esto es típico de la recuperación incompleta de una enfermedad infecciosa, surgiendo la fiebre cuando la infección misma se reestablece periódicamente.

✓ 21.14 Revisión de conceptos

La inflamación y la fiebre son respuestas inespecíficas a estímulos nocivos como los patógenos. Estas respuestas del hospedador pueden producir el rápido aislamiento y la destrucción del patógeno, pero también puede causar daño a los tejidos del hospedador.

✓ Describa los síntomas principales de la inflamación.
✓ Describa los tres tipos de fiebre.

Preguntas de repaso

1. Distinga entre *parásito* y *patógeno*. Distinga entre infección y enfermedad.
2. ¿Qué partes del cuerpo humano se hallan, en condiciones normales, fuertemente colonizadas por microorganismos? ¿Qué tienen en común estas partes del cuerpo? ¿Qué partes del cuerpo se encuentran normalmente desprovistas de microorganismos? ¿Qué tienen en común estas partes del cuerpo?
3. Distinga entre microorganismos *residentes* y *transeúntes* en una zona del organismo. ¿Cómo podría distinguir experimentalmente entre microorganismos residentes y transeúntes?
4. ¿Por qué los miembros del género *Streptococcus* favorecen la formación de la caries dental? ¿Por qué son capaces de causar más caries que otros microorganismos?
5. ¿Por qué el pH afecta al tipo de microorganismos del tracto gastrointestinal? ¿Por qué la concentración de oxígeno afecta al tipo de microorganismos del tracto gastrointestinal?
6. Describa la relación entre *Lactobacillus acidophilus* y glucógeno en el tracto vaginal. ¿Por qué las mujeres jóvenes tienen diferente biota en el tracto vaginal que las mujeres adultas?
7. Distinga entre glicocalix, cápsula y capa mucosa. ¿Cómo afectan a la adherencia celular estas estructuras?
8. Cite un ejemplo de microorganismo cuya patogenicidad dependa casi exclusivamente de su capacidad para producir toxinas. Defina la toxina y su modo de acción. Dé un ejemplo de microorganismo cuya patogenicidad dependa casi exclusivamente de sus características invasivas. ¿Qué factor o factores confieren a ese microorganismo la invasividad?
9. Distinga entre A-B toxinas, citotoxinas y superantígenos. Dé un ejemplo de cada categoría de toxina. ¿Cómo promueve cada toxina la enfermedad?
10. Defina el mecanismo de acción de la toxina tetánica y botulínica. ¿Qué relación tiene con su mecanismo de acción y por qué son tan peligrosas?
11. Revise el modo de acción de la enterotoxina del cólera. ¿Cuál es la terapia adecuada para esta enfermedad y por qué no es útil el tratamiento con antibióticos? Revise el modo de acción de la enterotoxina estafilocócica. ¿Cuál es la terapia normal de esta enfermedad y por qué no es útil el tratamiento con antibióticos?
12. Describa la estructura de una endotoxina típica. ¿Cómo produce fiebre la endotoxina? ¿Qué microorganismos producen endotoxinas?
13. ¿Cómo actúan la temperatura y el pH para limitar las infecciones bacterianas? ¿Dónde podría encontrar temperatura y pH diferentes de las condiciones normales del cuerpo? ¿Qué organismos podrían beneficiarse de cualquiera de estos agentes?
14. Distinga entre fiebre continua, fiebre remitente y fiebre intermitente. Nombre, al menos, un agente infeccioso causa causa cada tipo de fiebre. ¿Qué clase aparece con más frecuencia en las enfermedades infecciosas?

Ejercicios prácticos

1. ¿Por qué los efectos protectores del moco inhiben a la mayoría de los microorganismos? Describa los experimentos que demuestren los efectos del moco sobre la colonización bacteriana.
2. Las membrabas mucosas son barreras efectivas frente a la colonización y crecimiento de los microorganismos. Sin embargo, las membranas mucosas de la gargante son colonizadas por diferentes microorganismos que ocasionalmente producen enfermedad. Explique por qué un organismo no patógeno puede volverse patógeno en determinadas circunstancias. Esté seguro de describir un grupo de circunstancias que puedan favorecer la patogenicidad.
3. ¿Qué pasos están implicados en la formación de la placa dental? Describa y exponga los experimentos que demuestren la formación de la placa en superficies semejantes al diente y explique los experimentos diseñados para ilustrar los métodos biológicos de eliminación de la placa.
4. ¿Qué dentífrico puede prevenir la caries? ¿Cuáles serían las ventajas y los inconvenientes de esta estrategia? ¿Cómo podría comprobar la validez de esta estrategia en el laboratorio?
5. Ciertos antibióticos reducen a niveles mínimos los microorganismos del tracto intestinal. ¿Cómo afectaría al hospedador la reducción de la biota (microbiota) en su fisiología? La terapia antiobiótica de larga duración normalmente va seguida de infecciones por patógenos oportunistas, algunos de los cuales causan enfermedades en los pacientes de SIDA (*véase* Sección 26.14). ¿Qué patógenos pueden estar implicados? ¿Por qué los individuos que sufren tratamiento antibiótico son susceptibles a estos patógenos?
6. Describa cómo se diferencian los *Escherichia coli* enteropatógenos de los que no son enteropatógenos.
7. Cite, por lo menos, tres factores del hospedador que afecten al microorganismo en su colonización y creci-

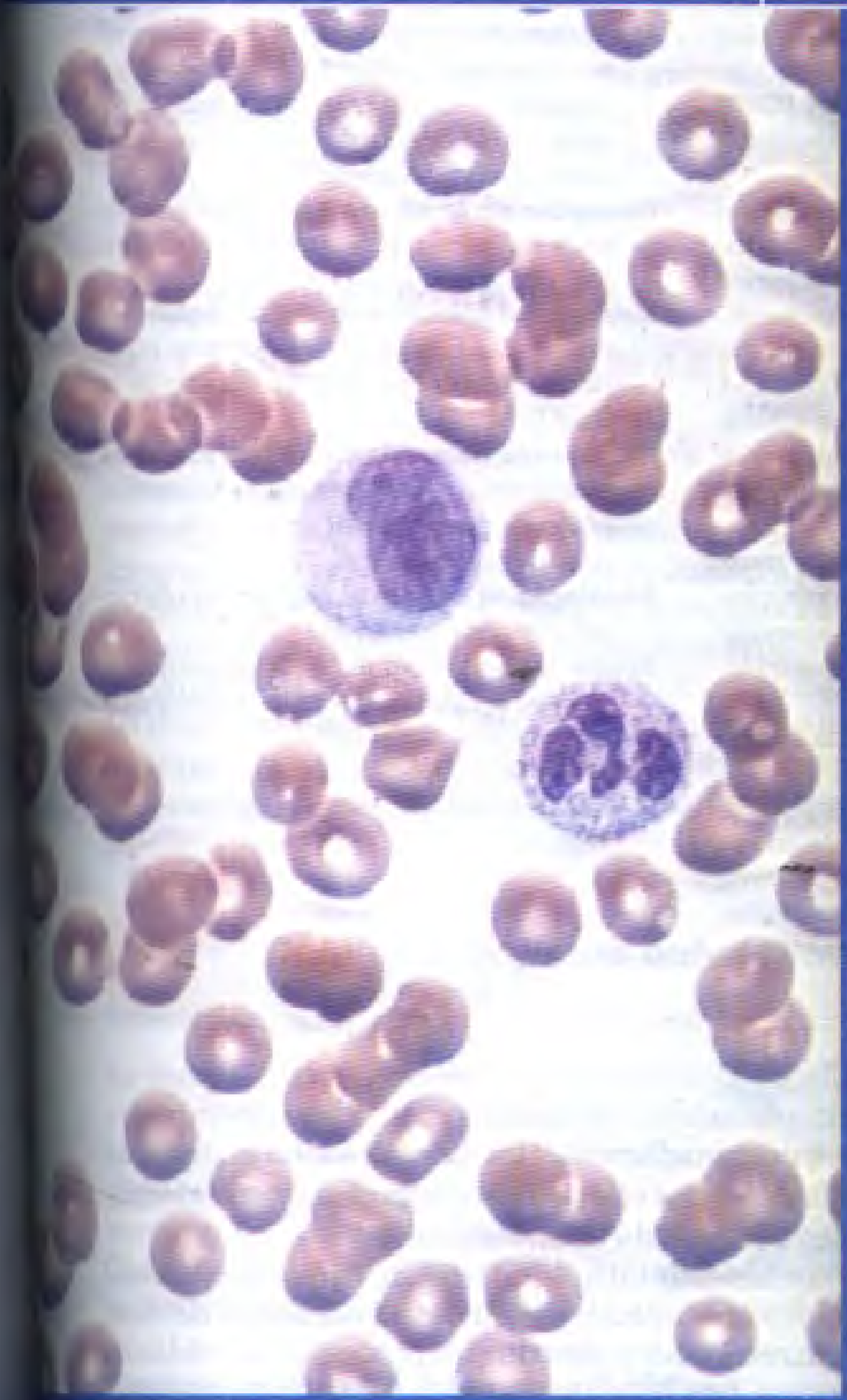
miento en un lugar del cuerpo. Incorpore este aspecto en un experimento *in vitro* que valide sus hipótesis.

8. Identifique presiones selectivas que puedan incrementar la virulencia y patogenicidad de *Streptococcus pneumoniae*. Identifique presiones selectivas que puedan incrementar la virulencia y patogenicidad de *Clostridium tetani*. ¿Podría un aumento de la virulencia en cualquiera de esos organismos determinar una ventaja selectiva para cualquiera de ellos? Para cada organismo esté seguro de considerar su hábitat natural.
9. La coagulasa es un factor de virulencia en *Staphylococcus aureus* que forma coágulos donde crece *S. aureus*. Estreptoquinasa es un factor de virulencia de *Sterptococcus pneumoniae* que actúa disolviendo los coágulos formados, donde crece *S. pneumoniae*. Reconcilie estas dos estrategias opuestas para potenciar la patogenicidad.
10. *Salmonella* tiene al menos 10 genes que actúan como factor de virulencia e incrementan la virulencia del patógeno. *Sterptococcus pneumoniae* un patógeno más virulento (*véase* Figura 21.15), se basa en un solo factor de virulencia. Revise los diferentes factores de virulencia y explique por qué un solo factor de virulencia es tan importante para *S. pneumoniae*. ¿Por qué no han evolucionado los patógenos humanos para tener factores de virulencia parecidos a *S. pneumoniae*?
11. Las vacunas para las exotoxinas de la difteria y del tátano se usan para prevenir la enfermedad (*véase* Sección 22.11). ¿Por qué no se desarrollan vacunas para las endotoxinas?
12. Los mutantes que no secretan exotoxinas son relativamente fáciles de aislar y los mutantes que carecen de endotoxinas son mucho más difíciles de aislar. Cómo podría conocer la estructura y función de las dos toxinas y explique la diferencia en la recuperación de mutantes.
13. Las quemaduras son las heridas más difíciles de tratar, principalmente porque se infectan fácilmente, a menudo con patógenos oportunistas. Explique por qué las heridas se infectan tan fácilmente, teniendo en cuenta las características físicas anatómicas y químicas que previenen habitualmente las infecciones y que usted ya conoce.
14. ¿Se debe tratar la fiebre siempre? Dé respuestas argumentadas basadas en la importancia de la inflamación y en la limitación de la infección.

El sistema inmunitario está organizado para prevenir la infección y contrarrestar la destrucción de nuestro cuerpo por microorganismos individuales. La inmunidad empieza por el reconocimiento de los patógenos por un grupo de células denominadas fagocitos, mostrados aquí como células fagocíticas con núcleos teñidos de violeta, entre los numerosos glóbulos rojos. Los fagocitos contactan con las células extrañas, las ingieren y destruyen, son capaces de mostrar en su superficie productos de los patógenos, estimulando así a otras células del sistema inmunitario llamados linfocitos. Los linfocitos reclutados desarrollan una respuesta inmunitaria duradera, de muchas células y moléculas de reconocimiento, que neutralizan los desafíos de cada patógeno.

22

INMUNOLOGÍA ESENCIAL



I GENERALIDADES DE LA RESPUESTA INMUNITARIA 749

22.1 Células y órganos del sistema inmunitario 749
22.2 Inmunidad inespecífica 752
22.3 La respuesta inmunitaria específica 754

II ANTÍGENOS, CÉLULAS T E INMUNIDAD CELULAR 756

22.4 Inmunógenos y antígenos 756
22.5 Presentación de antígenos a los linfocitos T 757
22.6 Las células T citotóxicas (Tc) y las asesinas naturales (NK) 760
22.7 Las células T cooperadoras: la respuesta inmunitaria activada 761

III ANTICUERPOS E INMUNIDAD 763

22.8 Anticuerpos (inmunoglobulinas) 763
22.9 Los linfocitos β y la producción de anticuerpos 766
22.10 Complemento, anticuerpos y destrucción de patógenos 767

IV LA RESPUESTA INMUNITARIA PARA PREVENIR LA ENFERMEDAD 769

22.11 Inmunidad para prevenir la enfermedad 769
22.12 Nuevas estrategias de inmunización 772

V INMUNIDAD FRENTE A LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS 773

22.13 Alergia, hipersensibilidad y autoinmunidad 773
22.14 Superantígenos 776

Glosario

Anticuerpo una proteína soluble producida por las células B que interacciona con el antígeno; se denomina también inmunoglobulina

Antígeno una molécula capaz de interaccionar con los componentes específicos del sistema inmunitario

Autoanticuerpo un anticuerpo dirigido contra antígenos propios

Célula asesina natural (NK, del inglés natural killer) un leucocito especializado que reconoce y destruye células extrañas o células infectadas del hospedador, sin que exista un reconocimiento específico del antígeno

Célula B un linfocito que produce inmunoglobulinas

Célula presentadora de antígeno (APC) cualquier célula cuya función esencial sea presentar antígeno a la célula T

Célula T linfocito responsable de las respuestas celulares específicas de antígeno. Los linfocitos T se subdividen en T citotóxicos (T_C) y T cooperadores (T_H). Los cooperadores se subdividen en T_H1 (células proinflamatorias) y T_H2, que ayudan a producir anticuerpos

Citocina modulador soluble de la respuesta inmune producido por leucocitos

Complejo principal de histocompatibilidad (MHC) un complejo génico que codifica diversas proteínas de superficie importantes en la presentación del antígeno a las células T

Complemento conjunto de proteínas que reaccionan secuencialmente con complejos antígeno-anticuerpo para amplificar o potenciar su actividad

Determinante antigénico la parte del antígeno que reacciona específicamente con un anticuerpo o un receptor de la célula T; se llama también epítopo

Dominio región de una proteína que generalmente posee un plegamiento definido y una función determinada

Especificidad característica de la respuesta inmune para interaccionar selectivamente con antígenos individuales

Hapteno una sustancia de bajo peso molecular que se combina con anticuerpos específicos, pero que es incapaz de desencadenar por sí misma una respuesta inmune

Hipersensibilidad respuesta inmune que ocasiona un daño en el hospedador, y que a veces se denomina alergia

Inmunidad capacidad de un organismo para combatir, de forma específica, una infección

Inmunidad mediada por anticuerpos (humoral) inmunidad producida por la estimulación de linfocitos B y que implica la interacción directa del antígeno con los anticuerpos

Inmunidad mediada por células (CMI) inmunidad debida a células T específicas de antígeno

Inmunización (vacunación) inoculación del hospedador con patógenos inactivados y atenuados, o productos de patógenos para estimular la protección inmunitaria

Inmunógeno molécula capaz de desencadenar una respuesta inmune

Inmunoglobulina (Ig) una proteína soluble producida por las células B que interacciona con el antígeno; se denomina también anticuerpo

Leucocito polimorfonuclear (PMN, neutrófilo) una clase de leucocitos con propiedades fagocíticas, citoplasma granular y núcleo multilobulado como, por ejemplo, los neutrófilos

Leucocitos células nucleadas de la sangre (células blancas de la sangre)

Linfa un líquido parecido a la sangre pero carente de eritrocitos y que fluye por un sistema circulatorio distinto (el sistema linfático) que consta de ganglios linfáticos cuya función es filtrar material particulado (v. g., bacterias)

Linfocitos una subpoblación de células nucleadas de la sangre que participan en una respuesta inmune

Macrófago una clase de leucocitos de tamaño grande con capacidad fagocítica

Memoria inmunológica capacidad de producir rápidamente grandes cantidades de células inmunes o anticuerpos específicos tras una nueva exposición a un mismo antígeno

Plasma la parte líquida de la sangre que queda al eliminar las células e inactivar los factores de la coagulación

Proteínas del MHC clase I proteínas presentadoras de antígeno que se expresan en todas las células nucleadas de los vertebrados

Proteínas del MHC clase II proteínas presentadoras de antígeno, expresadas fundamentalmente en macrófagos, células B y otras células presentadoras de antígeno (como las células dendríticas)

Receptor de la célula T receptor específico de antígeno que se expresa en la superficie de las células T

Respuesta primaria de anticuerpos anticuerpos fabricados tras la primera exposición al antígeno; la mayoría son de la clase Ig M

Respuesta secundaria de anticuerpos anticuerpos generados tras la segunda o posterior exposición al antígeno; la mayoría son de la clase Ig G

Serología el estudio *in vitro* de las reacciones antígeno-anticuerpo

Suero la porción líquida de la sangre que resulta de la eliminación de los factores de la coagulación y las células

Tolerancia incapacidad para producir una respuesta inmune contra antígenos específicos

---

Aquí introducimos la **inmunidad**, capacidad de los hospedadores de resistir la infección. La inmunidad conlleva las interacciones de distintas células y de sus productos para defenderse de la invasión e infección. En el Capítulo 21, hemos discutido los procesos físicos y químicos que se derivan de la inmunidad no específica, la capacidad innata del cuerpo para resistir la infección. La inmunidad no específica es también función de los fagocitos, células que captan y destruyen a la mayoría de patógenos. Desafortunadamente, los fagocitos y otras defensas no específicas no son efectivos por completo y las infecciones pueden ocurrir de vez en cuando.

Los fagocitos estimulan otra defensa, llamada *inmunidad específica*. La inmunidad específica es la habilidad del hospedador de reconocer y destruir un patógeno individual o sus productos. Los fagocitos pueden destruir parcialmente productos de los patógenos para activar los linfocitos, células especializadas en la respuesta específica. Un linfocito está programado para reconocer una proteína llamada *antígeno*, en el patógeno. Cuando el linfocito reconoce al antígeno del patógeno, crece y se divide muy deprisa, formando copias exactas de él mismo, o *clones*. Los clones de linfocitos destruyen el antígeno o producen sustancias solubles llamadas *anticuerpos* que se unen al mismo. Algunos linfocitos viven años. Si nos exponemos de nuevo al mismo patógeno, los linfocitos se expanden rápidamente y producen una respuesta inmune vigorosa. La habilidad de responder con más fuerza en los sucesivos encuentros con el antígeno se llama *memoria inmunológica*. El sistema inmunitario reacciona fuertemente con antígenos de patógenos, tiene un sistema propio para evitar el daño a los antígenos de nuestras células. La habilidad del sistema inmunitario para destruir los patógenos y prevenir la destrucción de las propias células se llama *tolerancia*. Desafortunadamente fallan a veces los mecanismos de tolerancia y se producen algunas enfermedades.

En resumen, los fagocitos presentan antígeno y activan a los linfocitos, induciendo la respuesta específica. Los linfocitos forman clones que reconocen los antígenos (especificidad), responden vigorosamente a la re-exposición de los antígenos (memoria) y no hacen daño a las células del hospedador (tolerancia). La respuesta inmune específica ha evolucionado para protegernos de los patógenos individuales; sin respuesta específica no podríamos sobrevivir.

I GENERALIDADES DE LA RESPUESTA INMUNITARIA

Una respuesta inmunitaria comienza con el reconocimiento del patógeno y termina con su destrucción. Aquí introducimos varios de los mecanismos de la respuesta inespecífica y específica de los hospedadores para los patógenos. Las respuestas no específicas reconocen todos los patógenos, mientras que las respuestas específicas reconocen cada patógeno individualizado. Comenzaremos por las células y órganos del sistema inmunitario y luego consideraremos los mecanismos de la respuesta no específica. Terminaremos con un vistazo a la respuesta específica o adaptativa.

22.1 Células y órganos del sistema inmunitario

La inmunidad inespecífica y específica se produce como consecuencia de la actividad de las células que circulan en la sangre y en el sistema linfático, dos de los principales fluidos corporales que interaccionan directa o indirectamente con cada uno de los principales sistemas orgánicos. Todas la células implicadas en la inmunidad tienen un precursor común: las células madre de médula ósea (*stem cells*).

Componentes de sangre y linfa

La **sangre** está formada por componentes celulares y no celulares. Contiene también muchas de las células y moléculas implicadas en la respuesta inmunitaria. Puesto que la sangre puede obtenerse de enfermos de una forma segura y fácil, constituye una fuente valiosa de material para las técnicas clínicas analíticas, incluyendo la mayoría de las pruebas de la respuesta inmune. La mayor parte de las numerosas células de la sangre humana son *eritrocitos* (células rojas de la sangre), células sin núcleo cuya función es la de transportar el oxígeno desde los pulmones a los tejidos (Tabla 22.1). Las células blancas de la sangre o *leucocitos* (0,1%) engloban varias células como los *monocitos*, así como los denominados *linfocitos* que participan en la producción de anticuerpos y en la inmunidad celular. La **linfa** es un líquido similar a la sangre pero sin eritrocitos.

TABLA 22.1 Principales elementos de la sangre en el individuo sano

Tipo celular	Células por mililitro
Eritrocitos	4,2-6,2 × 10^9
Leucocitos	4,5-11 × 10^6
Linfocitos	1,0-4,8 × 10^6
Monocitos	Hasta 8,0 × 10^5

Fuente: Henry, J.B. 1991. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 19ª edición. W. B. Saunders, Philadelphia.

Todas las células y elementos de la sangre y la linfa tienen un origen común. Como se muestra en la Figura 22.1, la médula ósea alberga unas células madre que son las progenitoras de todas las células maduras. Estas células madre se diferencian para originar células maduras en gran cantidad; este fenómeno está modulado por un grupo de proteínas celulares solubles denominadas **citocinas** (*véase* Sección 23.10).

Cuando se elimina de la sangre las células y las plaquetas, el fluido restante se llama *plasma*. Un componente importante del plasma es el fibrinógeno, una proteína que sufre una serie compleja de reacciones durante la formación del coágulo de fibrina. Puede evitarse la coagulación mediante la adición de un anticoagulante como oxalato potásico, citrato potásico o heparina. El plasma es estable sólo cuando se añade uno de los anticoagulantes citados. Si no se añade un anticoagulante, toda la sangre o el plasma forman rápidamente un coágulo. El líquido resultante de la coagulación se denomina *suero*. La elevada concentración de anticuerpos en el suero justifica su utilización profusa en las investigaciones inmunológicas (*véase* Sección 24.7).

Circulación sanguínea y linfática

La sangre es bombeada por el corazón a través de una red de arterias y capilares hacia distintas partes del cuerpo y regresa por las venas (Figura 22.2*a*, *b*). La Figura 22.2*b*, *c* muestra los lechos capilares por donde los leucocitos pueden pasar de la sangre hacia el *sistema linfático*, un sistema circulatorio distinto a través del cual circula la linfa.

La linfa drena desde los tejidos extravasculares hacia los capilares linfáticos y después hacia los **ganglios linfáticos** (Figura 22.2*d*), que se disponen en diferentes localizaciones a lo largo de todo el sistema linfático. Los ganglios linfáticos contienen grandes cantidades de leucocitos, dispuestos de manera tal que filtran los microorganismos y otros antíge-

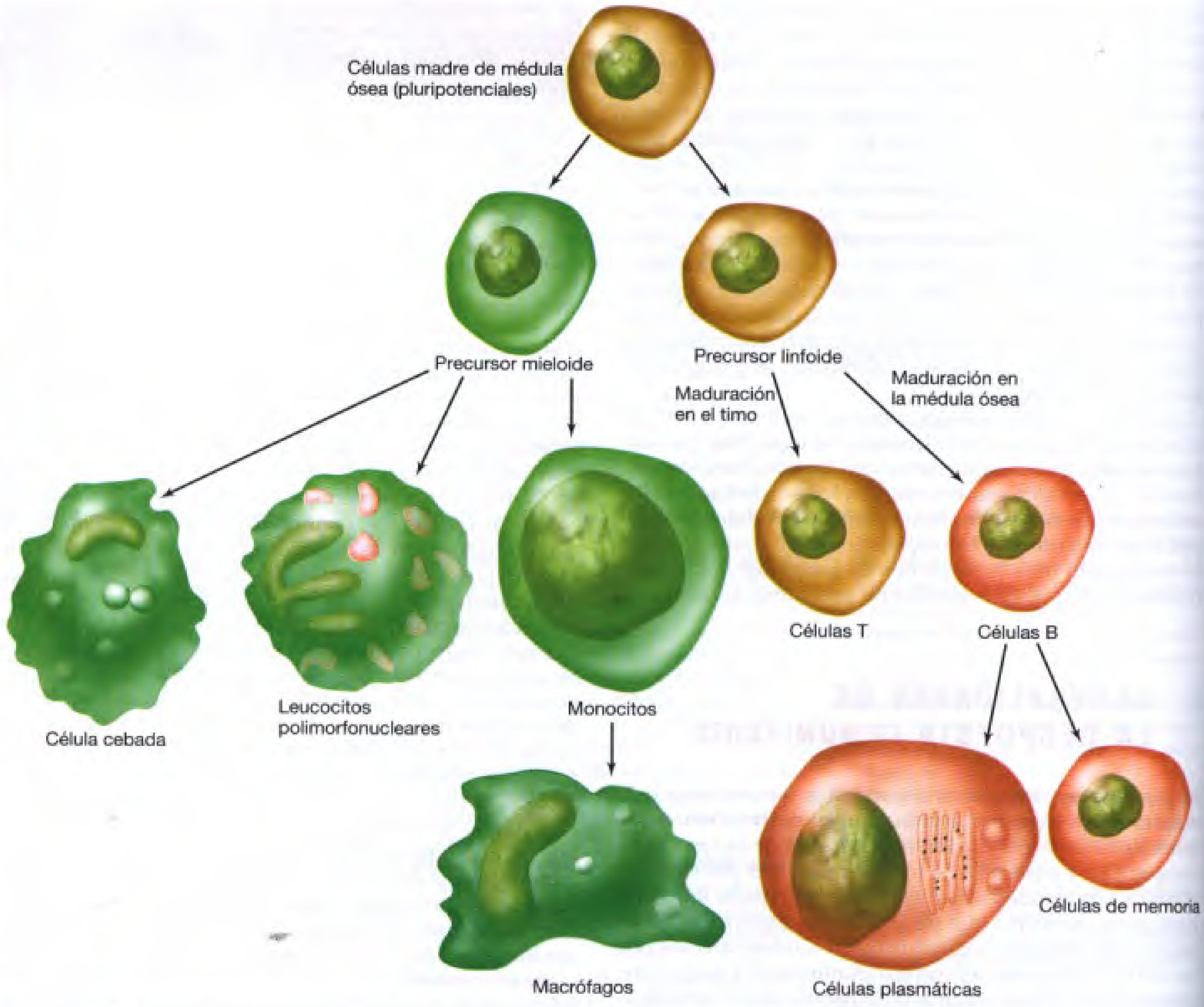

Células madre de médula ósea (pluripotenciales)
Precursor mieloide
Precursor linfoide
Maduración en el timo
Maduración en la médula ósea
Célula cebada
Leucocitos polimorfonucleares
Monocitos
Células T
Células B
Macrófagos
Células plasmáticas
Células de memoria

Figura 22.1 Origen de las principales células implicadas en la respuesta inmune. Existen dos líneas principales de precursores que participan en las respuestas inmunes: una generadora de células fagocíticas (precursores mieloides) y la otra generadora de células linfocíticas (precursores linfoides).

nos extraños. El bazo desempeña una función parecida en el sistema sanguíneo. Como resultado de esta actividad de filtración, los ganglios linfáticos pueden convertirse en focos infecciosos debido a que los organismos recolectados por los mecanismos de filtración pueden proliferar si no son destruidos. Los ganglios linfáticos y el bazo son también los lugares donde se produce la mayor parte de las respuestas inmunes. La linfa, consecuentemente, regresa al sistema circulatorio vía conducto linfático-torácico.

Leucocitos

Los **leucocitos** son las células nucleadas blancas de la sangre y la linfa. Existen distintas clases de leucocitos (Tabla 22.1), pero todos participan en funciones inmunes específicas e inespecíficas. En los ganglios linfáticos abundan unos leucocitos especializados denominados **macrófagos**, que se encargan de la filtración de la linfa, como se describirá más tarde (*véase* Sección 22.2). Otro tipo celular especial que se encuentra en el sistema linfático son los **linfocitos**, que están involucrados en la respuesta inmune específica. Se concentran también en los ganglios linfáticos y el bazo, e interaccionan con los antígenos. Los linfocitos se dividen en B y T (Figura 22.3). Las células **b** se originan y maduran en la médula ósea y son las precursoras de las células plasmáticas. Las células T se originan en la médula ósea, pero viajan al timo para madurar. Los linfocitos y algunas otras células linfoides pueden viajar a lo largo de todo el organismo y pasar libremente desde la sangre a los espacios in-

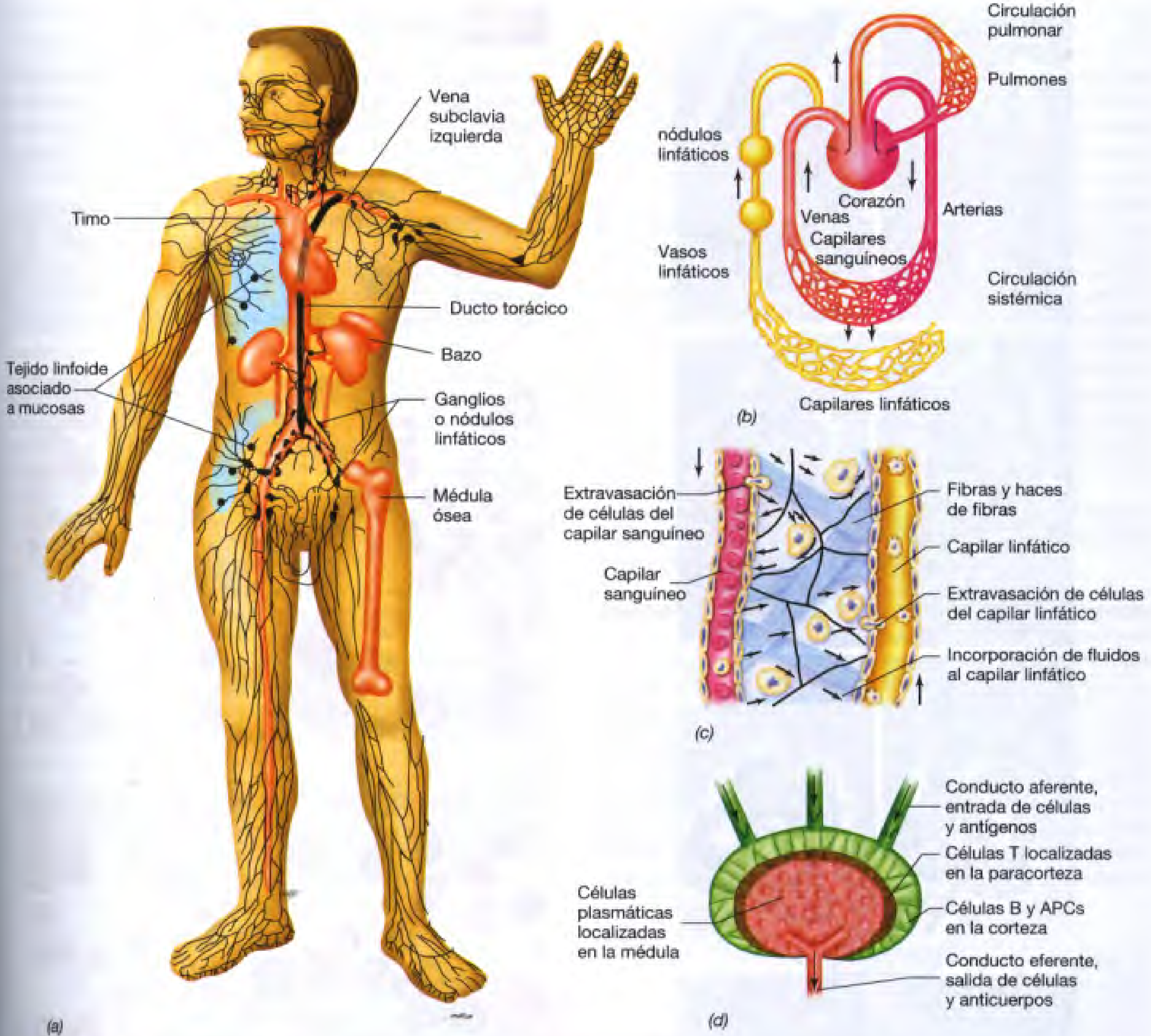

Vena subclavia izquierda
Timo
Ducto torácico
Bazo
Tejido linfoide asociado a mucosas
Ganglios o nódulos linfáticos
Médula ósea
(a)
Circulación pulmonar
Pulmones
nódulos linfáticos
Corazón
Venas
Arterias
Capilares sanguíneos
Vasos linfáticos
Circulación sistémica
Capilares linfáticos
(b)
Extravasación de células del capilar sanguíneo
Capilar sanguíneo
Fibras y haces de fibras
Capilar linfático
Extravasación de células del capilar linfático
Incorporación de fluidos al capilar linfático
(c)
Conducto aferente, entrada de células y antígenos
Células T localizadas en la paracorteza
Células plasmáticas localizadas en la médula
Células B y APCs en la corteza
Conducto eferente, salida de células y anticuerpos
(d)

Figura 22.2 Los sistemas sanguíneo y linfático. (a) Panorámica de los sistemas linfáticos más importantes, mostrando las localizaciones de los órganos principales. (b) Esquema que relaciona los sistemas linfático y sanguíneo. La sangre fluye desde las venas al corazón, de ahí a los pulmones donde se oxigena, y después a través de las arterias llega a los tejidos. (c) Visión al microscopio de la conexión entre los sistemas sanguíneo y linfático. A pesar de que los capilares sanguíneos y linfáticos son vasos cerrados, las células y los fluidos pueden pasar de un vaso a otro por un proceso denominado extravasación. (d) Un ganglio linfático. El diagrama describe las principales áreas anatómicas y las células inmunes.

tersticiales y a la linfa, y viceversa. Este proceso se denomina *extravasación* (Figura 22.2).

✓ 22.1 Revisión de conceptos

Todas las células implicadas en la inmunidad se originan a partir de una célula madre común en la médula ósea. Los sistemas circulatorios sanguíneo y linfático engloban los elementos celulares y no celulares (proteínas) que son importantes para las funciones del sistema inmunitario. En las respuestas inmunes participan distintos leucocitos.

- ✓ Dibuje un esquema del desarrollo de una célula B, una T y de los macrófagos desde el precursor ancestral común.
- ✓ Describa la circulación de un leucocito desde la sangre a la linfa y viceversa.

22.2 Inmunidad inespecífica

Los patógenos pueden romper a veces los mecanismos de defensa físicos y químicos del hospedador, descritos en el Capítulo 21 (*véase* Sección 21.12). Entonces el patógeno es capaz de llegar a los tejidos del hospedador y producir la infección (Sección 21.7). Cuando esto ocurre, el sistema inmune debe entrar en acción.

La puesta en marcha de la inmunidad, cuyo efecto final va a ser específico o inespecífico, celular o humoral, es el contacto de una célula con el patógeno o con una proteína inmunogénica, por ejemplo, una toxina. La célula que se halla involucrada en este primer contacto es un *fagocito*

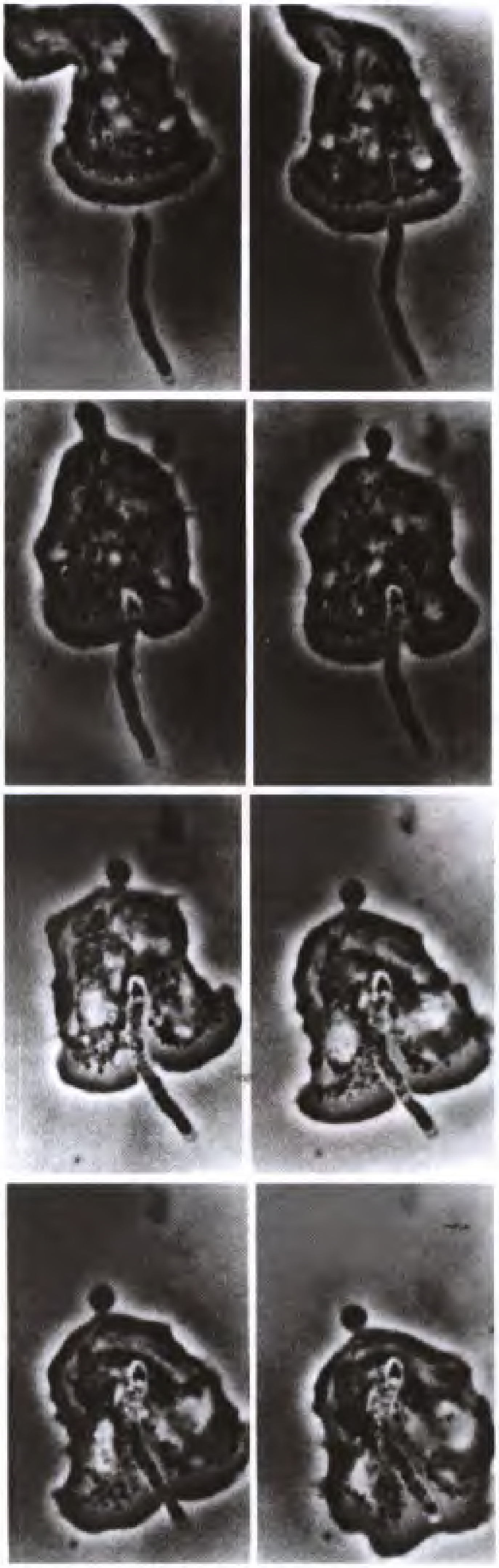
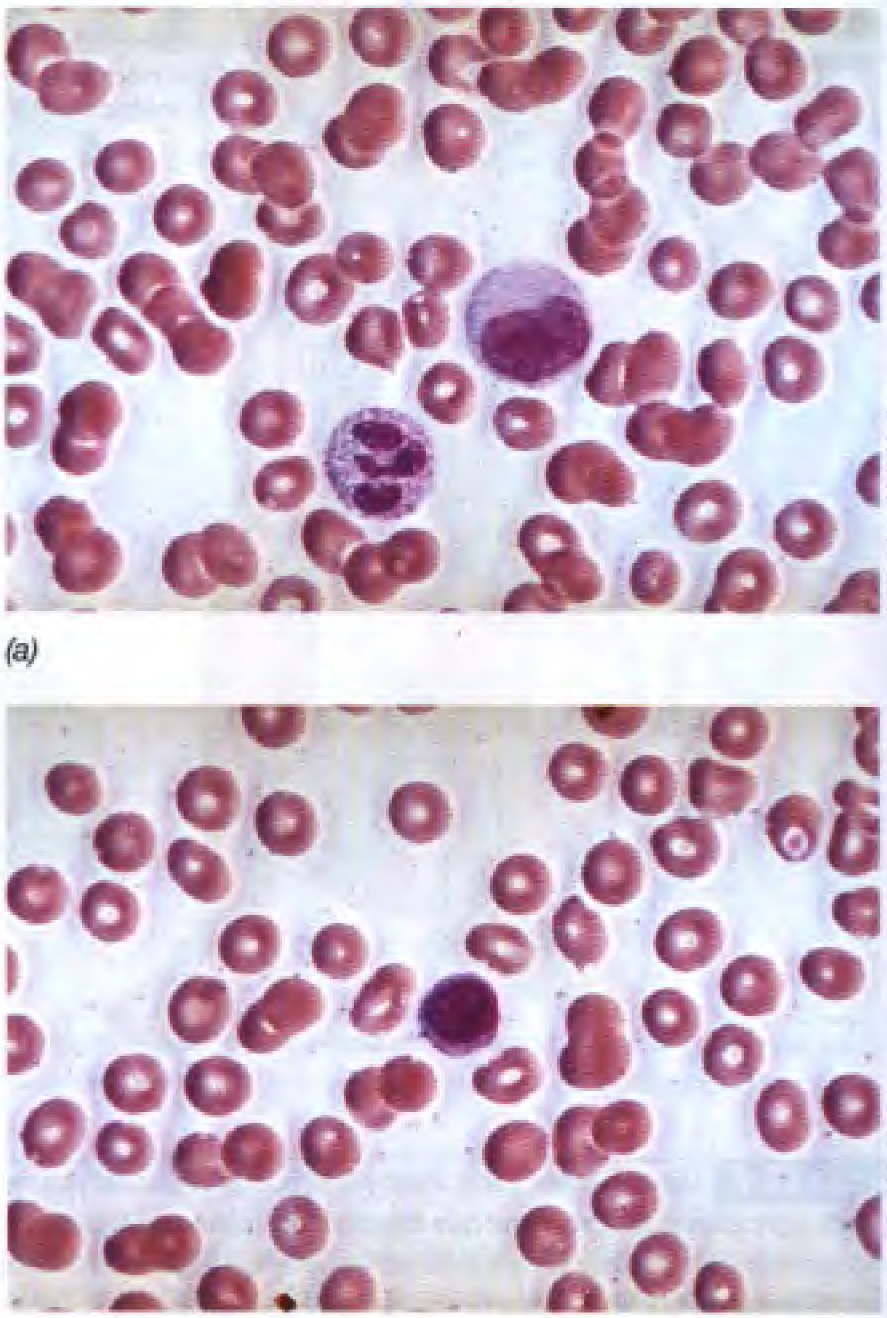

J. G. Hirsch

Figura 22.3 Fagocitosis: el microscopio de contraste de fases permite observar la ingestión y digestión de una cadena de *Bacillus megaterium* por un macrófago humano. La cadena bacteriana tiene una longitud aproximada de 18-20 µm. El macrófago es un grupo de células que ingieren y degradan patógenos y productos de patógeno.


(a)

J. Martinko y M. T. Madigan

(b)

J. Martinko y M. T. Madigan

Figura 22.4 Tipos principales de células inmunes. (a) Células fagocíticas. La célula nucleada en la parte inferior izquierda del centro de la preparación corresponde a un neutrófilo (PMN), caracterizado por un núcleo segmentado y un citoplasma granular. La célula nucleada de la derecha y ligeramente por encima del PMN es un monocito. Los fagocitos tienen un diámetro de 12-15 µm. El diámetro de los eritrocitos no nucleados es aproximadamente 6 µm. (b) La célula nucleada corresponde a un linfocito circulante. El citoplasma del linfocito generalmente es apenas visible y posee un diámetro de unos 10 µm, más pequeño que el de los fagocitos.

(literalmente, una «célula que come»). La función principal del fagocito es ingerir y destruir patógenos. En este proceso algunos fagocitos actúan como *células presentadoras de antígeno (APCs)* y generan los péptidos antigénicos que activan la respuesta inmunitaria. En esta sección examinaremos algunas de las células fagocíticas importantes y la capacidad de neutralizar patógenos.

Fagocitos

Algunos de los leucocitos presentes en la sangre son fagocitos, y la fagocitosis se produce también en diferentes tejidos y fluidos corporales. Generalmente los fagocitos son móviles y se mueven por un mecanismo denominado ameboide. La mayoría poseen inclusiones granulares denominadas *lisosomas*, que contienen sustancias bactericidas como peróxido de hidrógeno, lisozima, proteasas, fosfatasas, nucleasas y lipasas. Los fagocitos funcionan mejor cuando pueden atrapar un patógeno sobre una superficie como la pared de un vaso sanguíneo o un coágulo de fibrina. Después de adherirse a la célula, la membrana citoplasmática del fagocito se invagina e ingiere a la célula extraña. Se forma un fagosoma que finalmente se fusiona con los lisosomas formando una nueva vesícula llamada *fagolisosoma*. Las sustancias tóxicas y las enzimas que existen en el interior del fagolisosoma son capaces, por lo general, de destruir y digerir el microorganismo ingerido (Figura 22.3).

Un grupo de fagocitos, los **neutrófilos** o **leucocitos polimorfonucleares** (abreviadamente se denominan PMNs), son células muy móviles que contienen grandes cantidades de lisosomas (Figura 24.4*a*). Los PMNs son células que predominan en la corriente sanguínea y la médula ósea, pero que pueden aparecer en gran número en un foco infeccioso. Son atraídas mediante quimiotaxis por bacterias y componentes celulares. En términos generales, la presencia de grandes cantidades de PMNs en la sangre o en un foco inflamatorio indica infección activa.

Los **macrófagos** y los **monocitos** constituyen los otros grupos principales de células fagocíticas. Los macrófagos son células grandes capaces de ingerir y destruir la mayoría de patógenos y antígenos, así como de cooperar con los linfocitos en la generación de inmunidad específica. Los monocitos son células circulantes que se diferencian hasta ser macrófagos (Figuras 22.3 y 22.4*a*). De ahí que el término *macrófago* se use habitualmente para describir a los fagocitos que están fijos a las superficies de los tejidos, y que el término *monocito* describa al precursor circulante. Los macrófagos son más grandes que los monocitos y abundan en el tejido linfoide y el bazo, mientras que los monocitos predominan en la sangre y la linfa. Los macrófagos son importantes *células presentadoras de antígeno* (APCs); pueden presentar a las células T (específicas de antígeno) antígenos extraños parcialmente degradados, lo que constituye el primer paso en la respuesta específica. Esta característica especial de los macrófagos los convierte en un componente fundamental de la inmunidad específica de antígeno y examinaremos con mayor profundidad su función como APCs en la Sección 22.5.

El proceso inicial de la fagocitosis condiciona al fagocito, de tal suerte que es más eficaz en su función fagocítica y para la destrucción este de patógenos.

Destrucción fagocítica dependiente de oxígeno

Como se expuso en la Sección 5.13, distintas reacciones bioquímicas pueden conducir a la generación de compuestos de oxígeno tóxicos como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), aniones superóxidos (O_2^-), radicales hidroxilo ($OH\cdot$), singlete de oxígeno ($^1O_2$), ácido hipocloroso (HOCl) y óxido nítrico (NO). Las condiciones acídicas que se encuentran en el fagolisosoma ayudan en la generación de la reactividad tóxica de los compuestos de oxígeno. Las células fagocíticas emplean estas formas tóxicas del oxígeno para destruir las bacterias que han ingerido. La acción conjunta de estas dos enzimas fagocíticas dependientes de oxígeno,

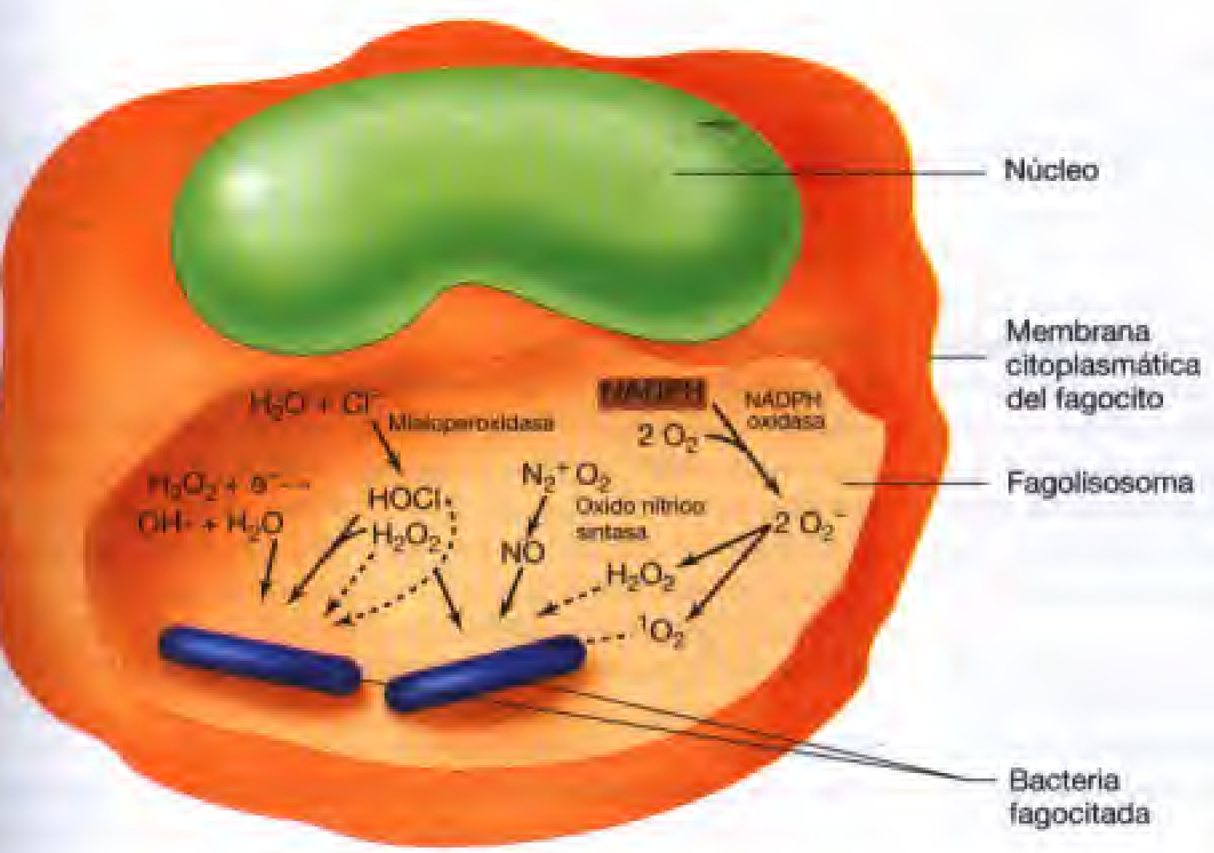


Figura 22.5 Acción de las enzimas fagocíticas en la generación de especies tóxicas de oxígeno. Éstas incluyen el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($OH\cdot$), el ácido hipocloroso (HOCl), el anión superóxido (O_2^-), el oxígeno molecular ($^1O_2$) y el óxido nítrico (NO). La formación de estos compuestos requiere un incremento sustancial de la utilización de oxígeno molecular, O_2. Esto conlleva el incremento en la toma de oxígeno y la consumición de oxígeno, que se conoce como *explosión respiratoria*. Para una mayor discusión de las especies de oxígeno, *véase* Sección 6.13.

genera niveles de radicales de oxígeno libre suficientes para destruir las bacterias ingeridas oxidando los elementos celulares clave. Estas reacciones ocurren en el interior de la propia célula fagocítica que permanece inalterada por los productos tóxicos del oxígeno. En la Figura 22.5 se resume la acción de las células fagocíticas en la destrucción mediada por el oxígeno.

Fracaso fagocítico

En algunos casos, los patógenos han desarrollado mecanismos para neutralizar los efectos de los productos tóxicos fagocíticos, para la destrucción del fagocito o para evitar la fagocitosis. Por ejemplo, el *Staphylococcus aureus* (*véase* Sección 26.9) produce unos compuestos pigmentados llamados *carotenoides*, que secuestran el singlete de oxígeno y evitan la destrucción (*véase* Sección 6.13). Los patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* (bacilo de la tuberculosis) crecen y persisten en el interior de las células fagocíticas (*véase* Sección 26.5). Aparentemente utilizan los glicolípidos fenólicos asociados a la pared celular (*véase* Sección 12.23) para eliminar los compuestos tóxicos de oxígeno. Estos glicolípidos son muy eficaces en la eliminación de radicales hidroxilo y aniones superóxido, que son las especies tóxicas del oxígeno más perjudiciales producidas por células fagocíticas.

Otros patógenos intracelulares producen proteínas denominadas *leucocidinas*, que destruyen a los fagocitos. En dichos casos, el patógeno no es destruido una vez ingerido sino que destruye al fagocito y queda libre. Los principales productores de leucocidinas son *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*. Los fagocitos destruidos constituyen la mayoría del material del *pus*; por tanto, los organismos que producen leucocidinas habitualmente son *piógenos* (formadores de pus) y causan infecciones localizadas que dan lugar a furúnculos o abscesos (*véanse* Secciones 21.7 y 26.9).

Otra defensa microbiana importante frente a la fagocitosis es la cápsula bacteriana (*véase* Sección 4.13). Las bacterias encapsuladas a menudo son muy resistentes a la fagocitosis, lo que se debe en apariencia a que la cápsula de algún modo impide la adherencia del fagocito a la célula bacteriana. El caso más claro de la importancia de la cápsula para impedir la fagocitosis es el del *Streptococcus pneumoniae*. Si se inyecta en un ratón sólo unas pocas células de una cepa encapsulada de esta especie (menos de 10 células), se inicia una infección que causa la muerte en unos cuantos días. Sin embargo, grandes cantidades de la cepa mutante acapsular son totalmente avirulentas. Otros componentes de la superficie distintos a la cápsula también pueden inhibir la fagocitosis. Por ejemplo, *Streptococcus pyogenes* produce una sustancia específica, la proteína M, a nivel de la superficie celular y las fimbrias (*véase* Sección 26.2). La proteína M parece alterar las propiedades de superficie de la célula bacteriana, de tal modo que impide la fagocitosis.

Los anticuerpos contra las cápsulas u otras moléculas de superficie habitualmente revierten el efecto protector de estos mecanismos de defensa bacterianos y estimulan la fagocitosis, un proceso que se conoce como *opsonización* (*véase* Sección 22.10).

✓ 22.2 Revisión de conceptos

Los fagocitos son las primeras células implicadas en la protección frente a los patógenos invasores, una vez que se han superado las barreras físicas y químicas. Son capaces de destruir a la mayoría de los patógenos, pero no a todos, muchos patógenos han desarrollado estrategias para inhibir la fagocitosis y la muerte. Muchos patógenos incrementan su supervivencia mediante mecanismos que inhiben la fagocitosis y la muerte.

- ✓ Describa por separado las funciones de los *PMNs* y los *macrófagos*.
- ✓ ¿Qué mecanismos dependientes de oxígeno utilizan los fagocitos para destruir a los patógenos?

22.3 La respuesta inmunitaria específica

El proceso general de la respuesta inmunitaria se ve en la Figura 22.6. Fagocitos como, por ejemplo, los macrofagos, digieren los patógenos y presentan antígenos peptídicos a los linfocitos denominados **células T**. Las células T reconocen el péptido a través de su receptor específico (TCR), localizado en la superficie de la célula T. Las células T interaccionan de forma específica con un único péptido antigénico. Algunas células T, T citotóxicas (T_C), *directamente* atacan a las células que presentan péptidos en su superficie. Hay otras células T cooperadoras (T_H) que secretan *citocinas* y que actúan *indirectamente* promoviendo la destrucción de otras células. Existen otras células, también de tipo T_H, que interaccionan con los *linfocitos B* y a través de ese contacto los linfocitos B producen una gran cantidad de inmunoglobulinas. Cada célula B produce un único anticuerpo. Los anticuerpos son proteínas solubles que interaccionan específicamente con el antígeno en la circulación sanguínea o en otros fluidos corporales, para neutralizar o destruir el antígeno.

Las respuestas inmunes específicas se dividen en dos categorías: **inmunidad celular** e **inmunidad humoral** (respuesta de anticuerpos). La inmunidad celular destruye las células por vía del reconocimiento del antígeno en la superficie celular como, por ejemplo, células infectadas por virus. La inmunidad humoral es efectiva frente a patógenos como virus o bacterias en la sangre o la linfa, y también frente a toxinas.

La inmunidad específica se caracteriza por las propiedades de *especificidad*, *memoria* y *tolerancia*.

Especificidad

La **especificidad** del antígeno anticuerpo o antígeno TCR es distinta de todos los mecanismos que hemos estudiado por ahora. La respuesta no específica desafía a todos los patógenos que entran en el cuerpo, incluso aquellos que el cuerpo no ha visto nunca antes. En la respuesta específica, hay unos días de retraso cuando se produce el primer contacto con el antígeno. Sin embargo, cuando la respuesta ocurre sólo se dirige a los antígenos del patógeno (Figura 22.7*a*).

Memoria

Una vez que el sistema inmunitario produce un tipo específico de anticuerpo o de célula T activada, la posterior expo-

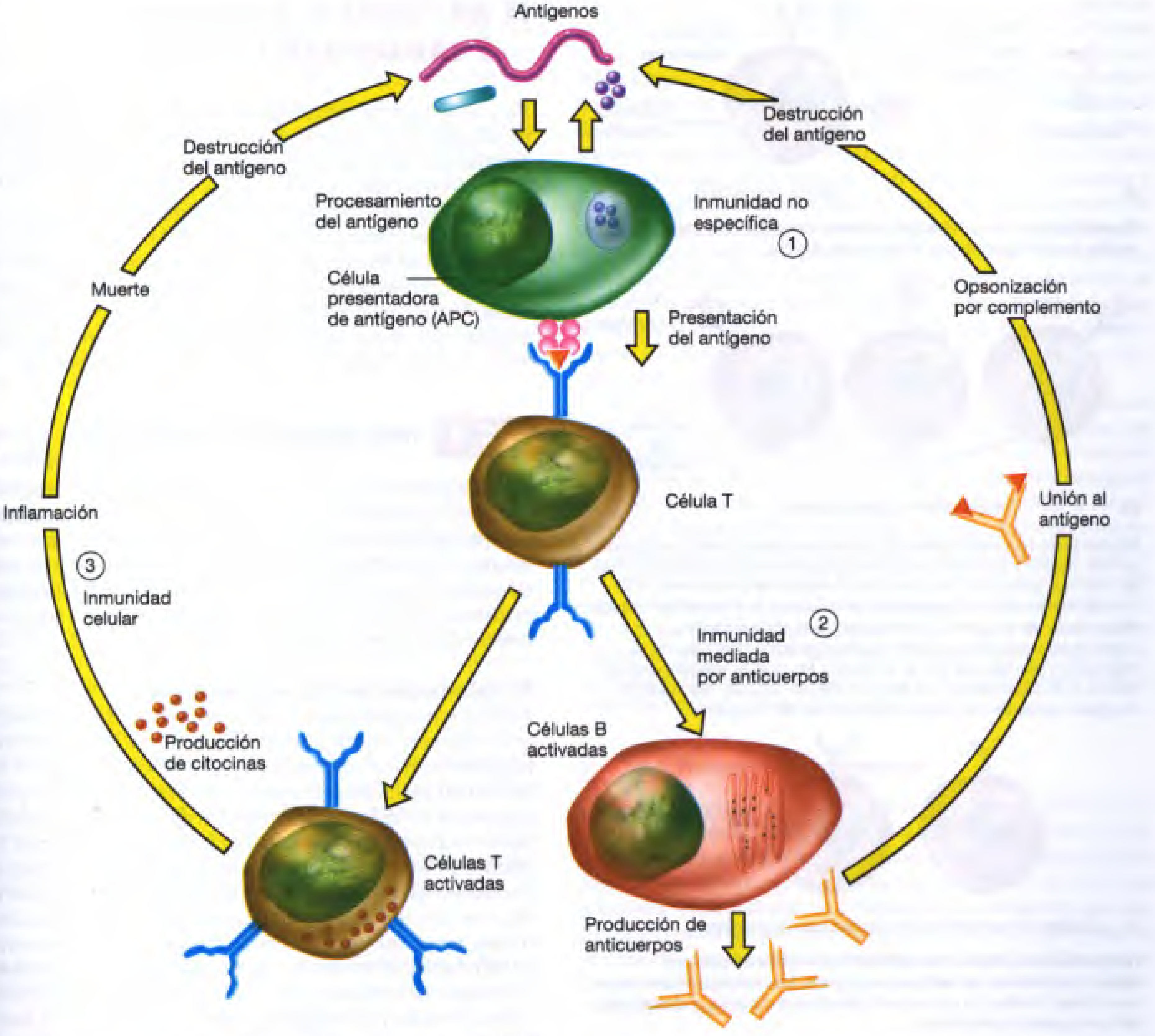
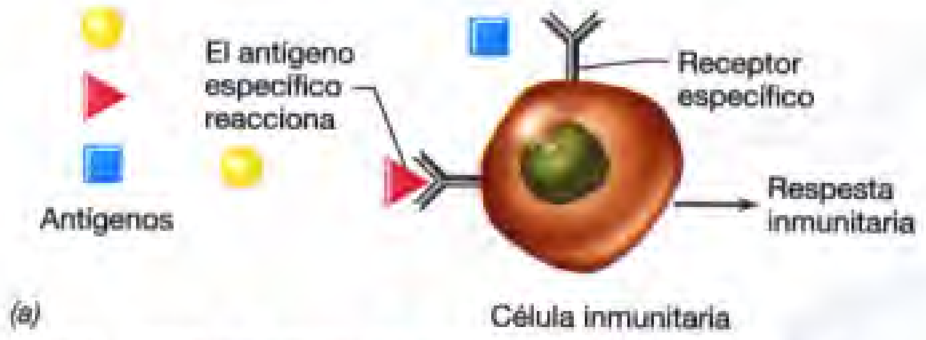

Antígenos
Destrucción del antígeno
Destrucción del antígeno
Procesamiento del antígeno
Inmunidad no específica
①
Célula presentadora de antígeno (APC)
Muerte
Opsonización por complemento
Presentación del antígeno
Célula T
Inflamación
Unión al antígeno
③
Inmunidad celular
②
Inmunidad mediada por anticuerpos
Células B activadas
Producción de citocinas
Células T activadas
Producción de anticuerpos

Figura 22.6 Vistazo general de la respuesta inmune. Los patógenos son destruidos por tres mecanismos: (1) inmunidad no específica; (2) inmunidad mediada por anticuerpos; y (3) inmunidad celular.

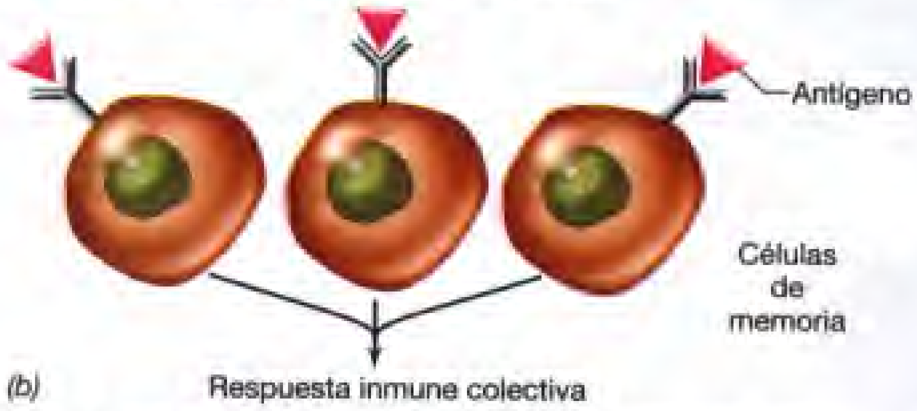
sición al mismo microorganismo origina la rápida producción de grandes cantidades del mismo anticuerpo o cantidades muy importantes de células T, que reaccionan con ese patógeno y lo destruyen. Esta capacidad amplificada de responder al estímulo tras la promera exposición se conoce como **memoria inmunológica** (Figura 22.7*b*). La memoria permite al hospedador resistir a los patógenos con los que ya ha tenido contacto. Se ha aprovechado este principio en el proceso de la vacunación, una práctica que consiste en la inoculación del hospedador de patógenos inactivos o atenuados, con el fin de estimular artificialmente la inmunidad y activar una protección específica frente a los patógenos peligrosos (*véase* Sección 22.11).

Tolerancia

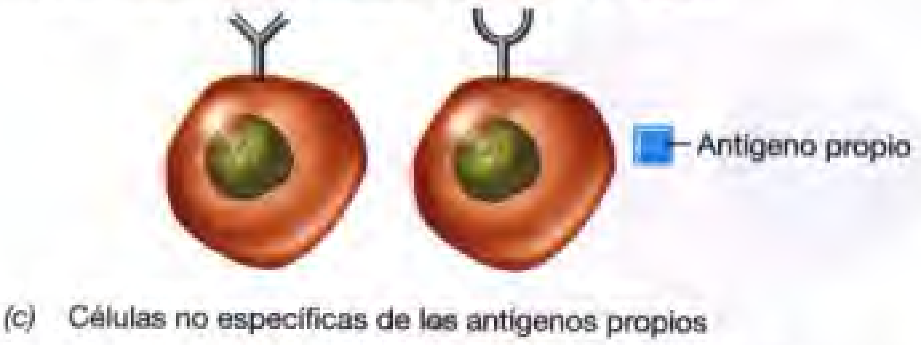
La **tolerancia** es la incapacidad para orquestar una respuesta inmune frente a determinados antígenos. Se debe a que las moléculas del hospedador son también antígenos potenciales. Sin embargo, en este caso, el sistema inmunitario aprende a no reconocer los antígenos propios. Las moléculas del hospedador serían dañadas si fueran reconocidas por anticuerpos o células T activadas (Figura 22.7*c*). A través de la tolerancia, la respuesta inmune del hospedador discrimina entre las moléculas extrañas (no propias y potencialmente perjudiciales) y las moléculas del hospedador (propias e inocuas), e interacciona adecuadamente con ellas.



Especificidad: las células del sistema inmunitario reconocen las moléculas (antígenos) por interacción directa.



Memoria: la respuesta específica frente a determinado antígeno es más rápida y potente después de la exposicón al antígeno más de una vez, porque el antígeno inicial induce el crecimiento y la división de las células, resultando en muchas copias de las células específicas de antígeno. La respuesta específica frente a determinado antígeno es más rápida y potente después de la esposicón más de una vez al antígeno. Porque el antígeno inicial induce la el crecimiento y la división de las células, resultado en muchas copias de las células específicas de antígeno.


Antígeno propio
(c)
Células no específicas de los antígenos propios

Tolerancia: las células del sistema inmunitario no pueden reaccionar frente a los antígenos propios. Las células propias que reaccionan frente a lo propio son destruidas durante el desarrollo de la respuesta iumunitaria.

Figura 22.7 Algunas claves sobre la respuesta inmune específica.

✓ 22.3 Revisión de conceptos

Los fagocitos no específicos presentan antígeno a las células T específicas, produciendo la respuesta efectora de las células T y los anticuerpos. Las células T y los anticuerpos actúan directamente o indirectamente para inactivar o destruir el antígeno. La respuesta inmunitaria se caracteriza por la *especificidad* por el antígeno, por la capacidad de responder más vigorosamente cuando se estimula con el mismo antígeno (*memoria*) y la habilidad de discriminar los antígenos propios de los no propios (*tolerancia*).

- ✓ Identifique las células implicadas en la respuesta celular y humoral.
- ✓ ¿Qué efectos tendría la rotura de la especificidad, memoria o tolerancia en la posibilidad de responder frente a un patógeno?

II ANTÍGENOS, CÉLULAS T E INMUNIDAD CELULAR

Para entender la inmunidad debemos antes entender las moléculas y estructuras de reconocimiento del sistema inmunitario. Por lo tanto discutiremos primero los *antígenos* y las moléculas que los reconocen. Porque las células T son las primeras que reconocen al antígeno, nuestro siguiente apartado se centrará en el papel de las células T en la inmunidad. Las células T están implicadas en una variedad de procesos, como la respuesta mediada por las células citotóxicas, las respuestas inflamatorias, y la cooperación que es necesaria para que las células B produzcan anticuerpos. En ausencia de células T no habría respuesta específica.

22.4 Inmunógenos y antígenos

Los **antígenos** son sustancias que reaccionan con anticuerpos o con receptores específicos de antígeno denominados **receptores de la célula T (TCRs)** que se encuentran en las células T. La mayoría de los antígenos son también **inmunógenos,** sustancias que inducen una respuesta. Aquí examinamos los inmunógenos, y definimos los antígenos que interaccionan con los anticuerpos y los TCR.

Propiedades de los inmunógenos

Todos los inmunógenos tiene en común ciertas propiedades, que incluyen *tamaño, complejidad* y *forma.* Por ejemplo, los **haptenos** son sustancias de bajo peso molecular que se combinan con moléculas de anticuerpo específico, pero que por sí mismos no inducen la formación de anticuerpos. Los haptenos incluyen moléculas de azúcares, aminoácidos y pequeños polímeros. Cuando se asocia a una proteína grande portadora (del inglés: *carrier*), son unos inmunógenos muy eficaces. Un requerimiento importante es que las moléculas deben tener un peso molecular generalmente superior a 10 000 dalton. El *tamaño molecular* adecuado es una indicación del potencial inmunogénico. Complejos, unidades no repetidas, como las proteínas son buenos inmunógenos. Los carbohidratos complejos son también buenos inmunógenos. En contraste, los ácidos nucleicos y los lípidos, como están formados de unidades repetidas, no son buenos inmunógenos. La complejidad molecular es un buen indicador de la inmunogenicidad. Las macromoléculas complejas en forma soluble o agregada (por ejemplo, proteínas precipitadas por calor) son generalmente excelentes inmunógenos. Los materiales insolubles son captados por los fagocitos produciendo una respuesta inmunitaria. En contraste, la forma soluble de las moléculas es un inmunógeno muy pobre, porque éstas no son tomadas por los fagocitos. Una *forma física* apropiada es otro buen indicador de inmunogenicidad.

Factores extrínsecos de los inmunógenos

Las propiedades de los inmunógenos son normalmente intrínsecas, pero varios factores *extrínsecos* influyen sobre la inmunogenicidad. Éstos incluyen la *dosis,* la ruta de *entrada,* y el carácter *extraño* del inmunógeno respecto al hospedador. La *dosis* del inmunógeno es un factor importante. Hay muchos tipos de dosis que confieren una inmunogenicidad importante. En general las dosis de 10 μg a 1 g. Las dosis por debajo de 10 μg o por encima de 1 g pueden no estimular una respuesta; bajas dosis extremas de antígeno o altas dosis extremas de antígeno producen tolerancia.

La *ruta* de administración de un inmunógeno es otra cuestión importante. Inmunizaciones dadas por vía parenteral (fuera del tracto digestivo), generalmente por inyección, son normalmente más efectivas que las dosis proporcionadas por vía tópica o por la boca.

La propiedad fundamental del inmunógeno es que éste sea *extraño* al hospedador. Como hemos podido ver, el sistema inmunitario está diseñado para reconocer y eliminar lo extraño (lo no propio). Nosotros nos hacemos tolerantes a las proteínas propias, pero serían potenciales inmunógenos en otros hospedadores.

Sitio de unión al antígeno de los anticuerpos y los TCR

El anticuerpo o el TCR no interacciona con toda la molécula de antígeno sino sólo frente a diferentes partes de la molécula que se denominan **determinantes antigénicos** o **epítopos** (Figura 22.8). Desde el punto de vista químico, los determinantes antigénicos engloban a los azúcares, aminoácidos y grupos orgánicos. De ahí que los haptenos ya mencionados sean verdaderos ejemplos de determinantes antigénicos individuales. Basta una región de 4 o 6 aminoácidos para definir un determinante antigénico. Las zonas protuberantes de molécula son un conjunto de determinantes antigénicos. Los anticuerpos pueden reconocer determinantes antigénicos de una proteína que estén muy alejados en la secuencia primaria, pero los plegamientos de la proteína (la estructura secundaria, la terciaria y la cuaternaria) los aproximarían (Figura 22.8 y Secciones 3.7 y 3.8). Estos **determinantes conformacionales** añaden complejidad a las macromoléculas. Una célula bacteriana o virus es un mosaico de proteínas, polisacáridos y otras moléculas, cada una de las cuales con varios determinantes antigénicos. Por ello los determinantes antigénicos de un microorganismo, o de una simple proteína, son extremadamente complejos. En términos generales, la especificidad de los anticuerpos es igualmente capaz de distinguir entre sustancias estrechamente relacionadas. Por ejemplo, los anticuerpos pueden distinguir entre los azúcares glucosa y galactosa que difieren sólo en la orientación de un grupo hidroxilo. Sin embargo, la especificidad no es absoluta y un anticuerpo puede reaccionar, al menos hasta cierto punto, con otros epítopos. El antígeno inductor del anticuerpo se denomina **antígeno homólogo** y los otros antígenos que reaccionan con el anticuerpo se llaman **antígenos heterólogos**. La interacción entre un anticuerpo y un antígeno heterólogo se denomina *reacción cruzada*.

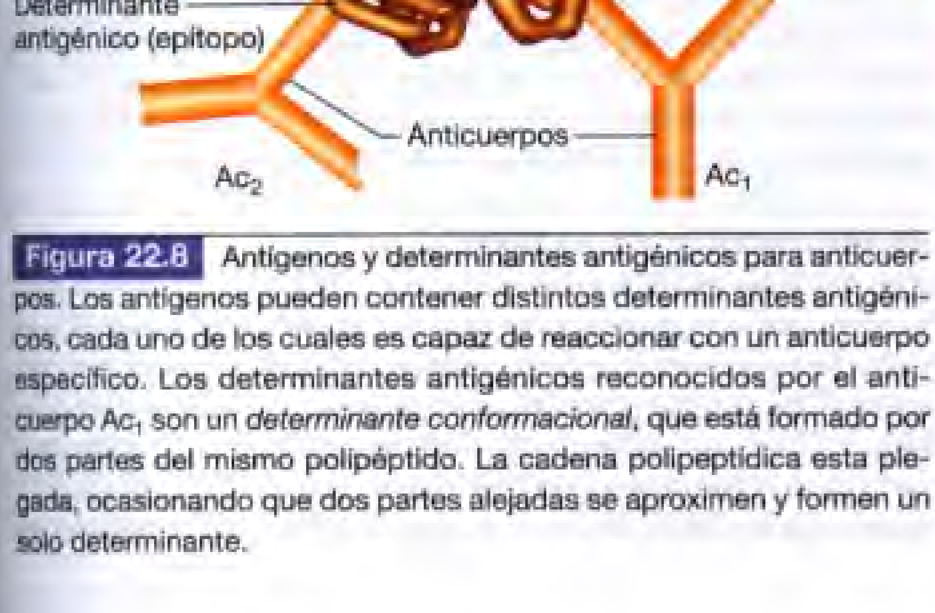

Determinante antigénico (epítopo)
Proteína (antígeno)
Determinante antigénico (epítopo)
Ac$_3$
Determinante antigénico (epítopo)
Anticuerpos
Ac$_2$
Ac$_1$

Figura 22.8 Antígenos y determinantes antigénicos para anticuerpos. Los antígenos pueden contener distintos determinantes antigénicos, cada uno de los cuales es capaz de reaccionar con un anticuerpo específico. Los determinantes antigénicos reconocidos por el anticuerpo Ac$_1$ son un *determinante conformacional*, que está formado por dos partes del mismo polipéptido. La cadena polipeptídica esta plegada, ocasionando que dos partes alejadas se aproximen y formen un solo determinante.

Mientras que generalmente los anticuerpos reconocen epítopos expresados en las superficies de las moléculas, los TCRs reconocen determinantes sólo después de que las moléculas hayan sido parcialmente degradadas. Este antígeno degradado o «procesado» es después presentado a las células T sobre la superficie de células especializadas presentadoras de antígeno (APCs), o sobre las células diana (*véanse* Secciones 22.5 y Figura 22.11). Puesto que el procesamiento y la presentación del antígeno habitualmente destruyen la estructura conformacional de un antígeno, generalmente los epítopos que reconoce la célula T constan de secuencias lineales de aminoácidos más que de epítopos conformacionales reconocidos por anticuerpos.

✓ 22.4 Revisión de conceptos

Los inmunógenos son moléculas extrañas que inducen una respuesta inmunitaria. Tamaño, complejidad y forma son las propiedades intrínsecas de los inmunógenos. Cuando los inmunógenos son introducidos en el hospedador con una dosis y por una ruta adecuada, éstos inducen una respuesta. Los antígenos son moléculas reconocidas por los anticuerpos y los TCR. Los epítopos reconocidos por los anticuerpos son estructuras del antígeno conformacionales, mientras que los epítopos de la célula T son habitualmente lineales.

- ✓ Distinga entre inmunógenos y antígenos.
- ✓ Identifique los determinantes intrínsecos y extrínsecos de los inmunógenos.

22.5 Presentación de antígenos a los linfocitos T

Los linfocitos T, o células T, son linfocitos que interaccionan específicamente con los antígenos sobre la superficie de las células T denominadas *receptores de las células T* (*TCRs*). Los TCRs interaccionan con las APCs por las proteínas del *complejo principal de histocompatibilidad* (*MHC*).

Estructura del receptor de la célula T (TCR)

El TCR es una proteína de membrana que se extiende desde el interior de la célula al espacio extracelular. Cada receptor tiene miles de copias en la superficie celular. El TCR

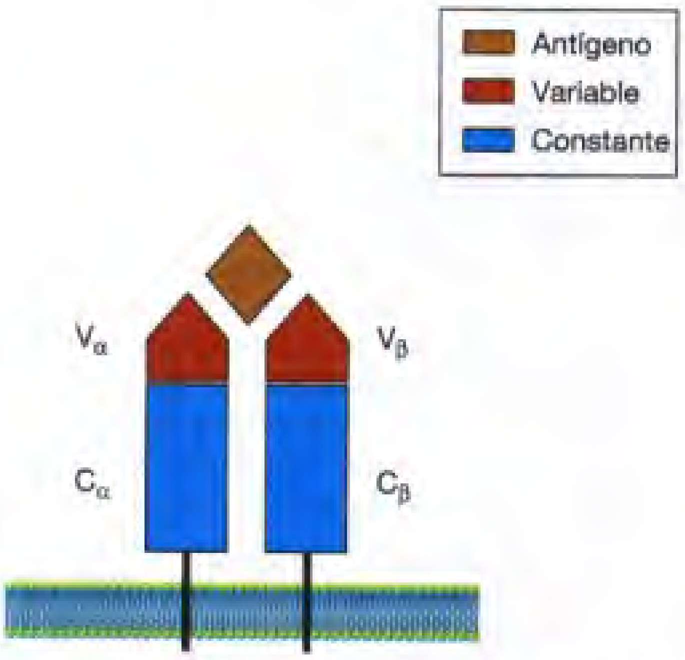


Figura 22.9 Estructura del receptor de la célula T (TCR). Los dominios V de la cadena α y β se combinan para formar la unión del péptido antigénico.

consta de dos péptidos unidos por puentes disulfuro, denominados alfa (α) y beta (β). Cada cadena tiene un dominio variable (V) y un dominio constante (C) (Figura 22.9). Vα y Vβ cooperan en la unión al antígeno. Como veremos en la Sección 23.7, el sistema inmunitario tiene la habilidad de generar TCRs que se unirán a cualquier péptido antigénico. De todas formas, el TCR sólo puede reconocer al antígeno si no está unida a una proteína denominada *complejo principal de histocompatibilidad* (MHC).

Proteínas de histocompatibilidad (MHC)

Estas proteínas están codificadas por una región genética presente en todos los vertebrados, denominada **complejo principal de histocompatibilidad** (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*). Las proteínas MHC están producidas por numerosos genes de este complejo y se denominan en conjunto *antígenos leucocitarios humanos* o HLAs. Al descubrirse las moléculas MHC, se consideró a éstas como las principales moléculas diana en el rechazo de un trasplante. Si los tejidos de un animal o de un donante humano se rechazan de forma aguda cuando se transplantan a otro animal o a un paciente, esto implica que sus proteínas MHC son distintas. Ahora sabemos que las proteínas MHC funcionan como moléculas presentadoras de antígeno y que interaccionan con el antígeno y el TCR. De ahí que las proteínas MHC sean un *tercer* conjunto de moléculas de unión al antígeno y jueguen un papel integral en la respuesta inmune. Los genes MHC codifican dos tipos diferentes de proteínas, denominados de *clase I* y de *clase II*. Las proteínas MHC de clase I están sobre la superficie de *todas* las células nucleadas. Las proteínas MHC de clase II se encuentran sólo en la superficie de linfocitos B, macrófagos y otras células presentadoras de antígeno (APCs). Las razones de esta diferente distribución podrán entenderse mejor cuando expongamos la función de estas moléculas.

Las proteínas MHC de clase I constan de dos polipéptidos (Figura 22.10*a*); la cadena alfa (α), codificada en la región génica del MHC; y otro polipéptido de clase I denominado *β2-microglobulina (β_2m)* y está codificado por un gen que no se localiza en el MHC. Las proteínas MHC de clase II constan de dos polipéptidos glicosilados unidos no covalentemente, llamados α y β. Al igual que las moléculas de clase I, estos polipéptidos se hallan anclados en la membrana citoplasmática y se proyectan al exterior a partir de la superficie celular (Figura 22.10*b*).

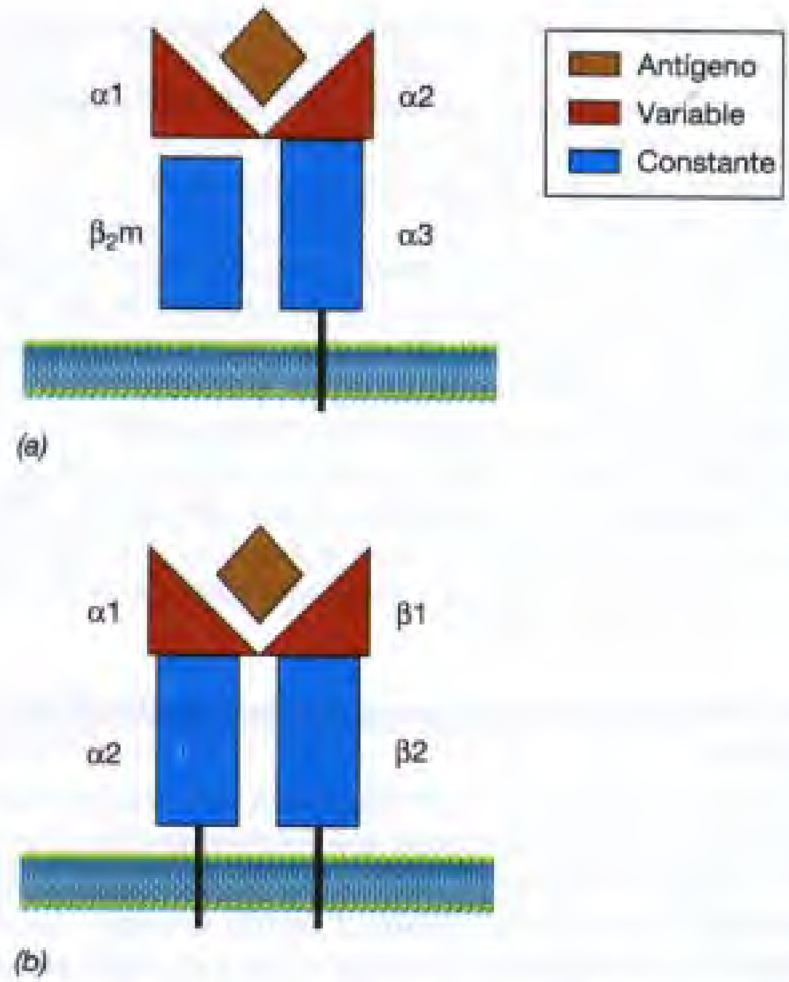


Figura 22.10 Estructura del MHC. (a) Clase I del MHC. Los dominios α1 y α2 se combinan para formar la unión del péptido antigénico. (b) Clase II del MHC. Los dominios α1 y β1 se combinan para formar la unión del péptido antigénico.

Las proteínas MHC no son estructuralmente idénticas *dentro* de una especie determinada. Individuos distintos muestran habitualmente diferencias sutiles en la secuencia de aminoácidos de sus moléculas MHC. Estas variaciones limitadas de la secuencia se denominan *polimorfismo*. En el hombre, por ejemplo, pueden existir varios cientos de alelos MHC. Las proteínas del MHC son la razón por la que no se admiten los transplantes de un individuo a otro; son reconocidos como no propios y son, pues, rechazados. La estructura molecular y la organización de los genes y las proteínas son presentadas en el Capítulo 23.

Presentación de antígeno

Las proteínas MHC sirven como puntos de referencia molecular que permiten a las células T identificar antígenos extraños. En un animal normal, las células T, a través de sus TCRs, interaccionan constantemente con proteínas u otros antígenos potenciales; deben ser capaces de discriminar los antígenos propios de los no propios. La célula T, a través de su TCR, se une a las moléculas MHC y entonces puede reconocer los antígenos extraños embebidos en la estructura del MHC; una célula T no puede reconocer un antígeno extraño a menos que sea presentado en el contexto de una proteína MHC.

¿Cómo ocurre esto? Como se expuso con anterioridad, cuando un antígeno es captado por una célula del hospedador, la célula lo degrada (procesa); este antígeno procesado acaba por quedar embebido o unido a la proteína MHC, y el complejo va hasta la membrana citoplasmática y se presenta en la superficie de la célula. Se conocen dos mecanismos distintos para el procesamiento del antígeno, uno para la presentación de antígenos de clase I y el otro para la presentación de antígenos de clase II (Figura 22.11). En el esquema de clase I (Figura 22.11*a*), los antígenos son degradados en el citoplasma y unidos a proteínas de clase I en el retículo endoplásmico. El péptido procesado tiene unos 10 aminoácidos. Este método de contacto antigénico es muy importante en varias infecciones víricas, donde la célula hospedadora es la responsable de la síntesis de las proteínas víricas. Los péptidos víricos degradados que no son propios forman complejo después con proteínas de clase I y son exportados a la superficie celular, donde son reconocidos por células T específicas a través de TCRs específicos de antígeno. Las células T se activan y, como son efectores de la respuesta inmune celular, destruyen la célula que contiene el virus, que se convierte así en una *célula diana* para la respuesta inmune.

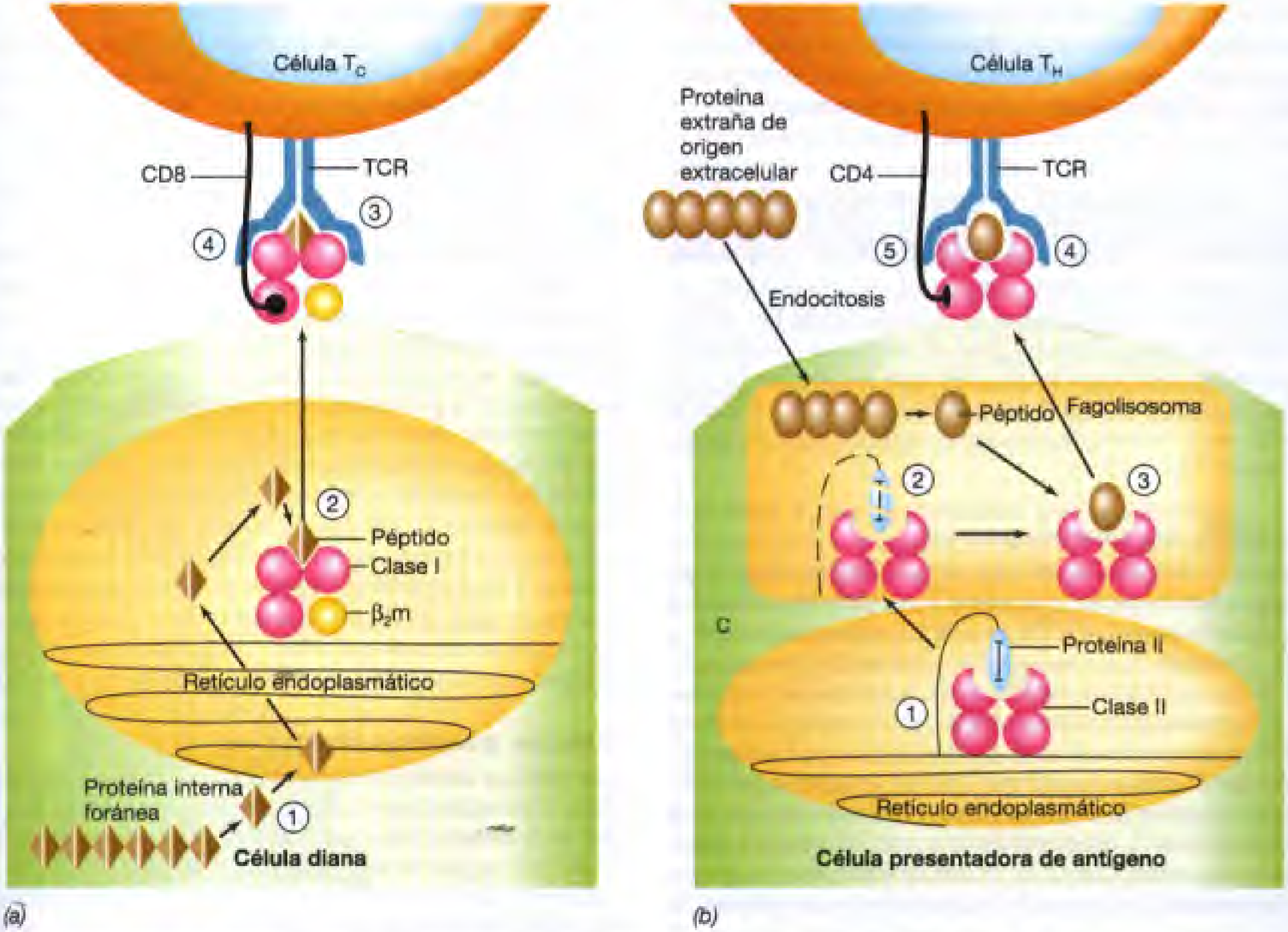


Figura 22.11 Presentación antigénica por proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I y clase II. (a) En la vía de presentación antigénica de clase I se forman y se ensamblan las proteínas de clase I en el retículo endoplasmático. ① Los antígenos proteicos producidos en la célula, por ejemplo antígenos víricos y tumorales, son degradados en el citoplasma y transportados a través de la membrana del retículo endoplasmático. ② Los péptidos se unen a la clase I y son transportados a la superficie de la célula, e interaccionan ③ con el receptor de la célula T (TCRs), en la superficie de las T_C. ④ El correceptor CD8 de la célula Tc también interacciona con el MHC de clase I, dando lugar a un complejo más estable. Las células T_C pueden entonces liberar citocinas y citotoxinas, proteínas que destruyen la célula diana. Cualquier célula nucleada puede actuar como una célula diana para la clase I. (b) En la vía de presentación antigénica de clase II: ① Las proteínas de clase II se producen en el retículo endoplasmático y se ensamblan con una proteína bloqueante, Ii (cadena invariante), que evita que la clase II forme complejo con otros péptidos fabricados en el retículo endoplasmático. ② Después, la clase II va al fagolisosoma donde Ii y las proteínas extrañas, importadas desde el exterior de la célula (por endocitosis), son digeridas. ③ A continuación la proteína de clase II se une a los péptidos extraños procesados y el complejo se expresa sobre la superficie celular ④ donde interacciona con los TCRs y ⑤ el correceptor CD4 de las células T_H. Las células T_H liberan después citocinas que estimulan a las células del sistema inmunitario potenciando la respuesta. Sólo las APCs pueden ser contactadas por las T_H, que reconocen los péptidos asociados a la clase II. Las APCs son monocitos, macrófagos, células dendríticas y células B.

En efecto, las moléculas MHC actúan como una *plataforma* sobre la que se une el antígeno extraño. Luego el TCR reconoce al antígeno (no propio) y el MHC (propio). Esta interacción célula-célula induce a las células T citotóxicas, que inducen proteínas llamadas perforinas (*véase* Sección 22.6) que matan a las células infectadas por virus (*células diana*).

Un segundo esquema de presentación antigénica involucra a la molécula de clase II (Figura 22.11*b*). En este caso, las moléculas de clase II se completan con un polipéptido propio denominado *Ii* o cadena invariante (Ii) (*véase* Sección 22.2). Cuando el fagosoma que contiene el antígeno fagocitado se fusiona con el lisosoma formando un *fagolisosoma*, los antígenos son digeridos por enzimas proteolíticos junto con la cadena *Ii*, que acompaña a las moléculas de clase II y es la responsable de que estas moléculas se dirijan hacia la zona donde se degradan los antígenos extraños captados del exterior celular. Los péptidos generados, habitualmente de unos 11 a 15 aminoácidos de longitud (ligeramente mayores que los péptidos de unión a clase I), se unen entonces al sitio de unión del antígeno de clase II recién expuesto y todo el complejo se expresa a la postre sobre la membrana citoplasmática externa donde es presentado a las células T_H. Las células T_H, a través del TCR, reconocen a continuación el complejo MHC de clase II-péptido extraño sobre la superficie de las APCs. Las células T_H son activadas por el contacto con el antígeno extraño y secretan moléculas que estimulan la producción de anticuerpo por clones específicos de células B, o secretan un conjunto de citocinas proinflamatorias (*véanse* Secciones 22.7 y 22.9).

CD4 y CD8, los correceptores

Aparte del TCR todas las células tiene una proteína de superficie que actúa como correceptor. Por ejemplo, las células Th expresan la proteína CD4, que actúa como correceptor, y las Tc expresan la proteína CD8, que actúa como correceptor (Figura 22.11). Cuando el TCR se une al péptido-MHC, el correceptor se une al MHC, reforzando la unión y activando a su vez la célula T. CD4 sólo se une a las proteínas de clase II, asegurando que los Th se unan a las APC que expresan clase II. Por otro lado, CD8 sólo se une a las proteínas de clase I, asegurando la unión con clase I. Además, estas dos moléculas CD4 y CD8 sirven como muy convenientes marcadores para distinguir *in vitro* las células Th y Tc.

✓ 22.5 Revisión de conceptos

Las células T reconocen el antígeno presentado por fagocitos especializados o por células infectadas de patógenos. A nivel molecular, los TCR interactúan con antígenos presentados por el MHC. Las interacciones molecular pueden estimular a las células T para matar a las que portan el antígeno extraño o producir unas proteínas que se denominan citocinas.

- ✓ ¿En qué células se encuentran las proteínas MHC de clase I y de clase II?
- ✓ Defina los procesos de presentación antigénica para los patógenos intracelulares y los extracelulares.

22.6 Las células T citotóxicas (Tc) y las asesinas naturales (NK)

En la sección previa hemos introducido dos clases de linfocitos T, los T_C y los T_H. Aquí examinaremos la función citotóxica en detalle. Asimismo examinaremos las células asesinas naturales, que también matan a las células infectadas. Examinaremos la función de los Th en la Sección 22.7.

Linfocitos T citotóxicos

Las *células T citotóxicas* (células T_C), también llamadas linfocitos T citotóxicos (CTLs), participan en la destrucción de células infectadas, que presentan antígenos extraños en su superficie. Como se mencionó anteriormente en relación con el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (*véase* Sección 22.5), las células T_C reconocen antígenos extraños presentados por moléculas MHC de clase I. Cualquier célula que porte un antígeno extraño, como ocurre en aquéllas que hospedan a virus, puede ser lisada por células T_C.

Es necesario el contacto entre una célula T_C y una célula diana para que se produzca la lisis. El inicio de dicho contacto depende del TCR: el complejo Ag-MHC (Figura 22.11*a*). El contacto con la célula diana provoca el acúmulo de los gránulos en los sitios de contacto con la célula T y la liberación de su contenido. Estos gránulos contienen monómeros de *perforina*, que traspasa la membrana de la célula diana, se polimeriza y forma un poro. De hecho no se excreta sólo la perforina, sino también gránulos que contienen *granzima*, proteína que causa *apoptosis* o muerte celular programada. Cuando la granzima entra por los poros de la perforina, la célula se contrae y degrada todos sus componentes (Figura 22.12). Las Tc no son afectadas por el proceso; sus membranas no son afectadas por la perforina. Las células T matan sólo las células que expresan antígenos extraños porque la degranulación ocurre cuando las células expresan antígenos extraños. Las células que no expresan antígenos extraños no establecen el contacto y no mueren.

Células asesinas naturales

Las **células asesinas** representan una nueva clase de linfocitos distintos a las células T citotóxicas que juegan un papel en la destrucción de células extrañas. Las *células asesinas* (NK, del inglés *natural killer*) no son células T ni B. Tras la estimulación, su número no aumenta, ni se genera memoria. Sin embargo, las células NK se parecen a las células T_C en su capacidad para destruir células extrañas. Por ejemplo, las células NK utilizan la perforina y la granzima para lisar sus células diana. Sin embargo, las células NK difieren de las células T_C en que estas últimas, no pueden destruir en *ausencia* de estimulación por un antígeno específico. Las células NK son capaces de destruir células neoplásicas y células infectadas por virus, *in vitro*, sin previa exposición o contacto con el antígeno extraño.

La diana molecular para las células NK parece ser la *ausencia* de proteínas MHC de clase I adecuadas. Las células NK reconocen las células normales y sus proteínas de clase I a través de un conjunto de receptores especiales para clase I. La unión de estos receptores a la clase I *desactiva* el mecanismo lítico aunque, cuando no existe unión, el mecanismo lítico es activo y la célula NK lisa a la célula que no reconoce. Como se mencionó previamente, las principales dianas de las células NK son las células tumorales y las infectadas por virus, que con frecuencia presentan una expresión de clase I disminuida o alterada.

✓ 22.6 Revisión de conceptos

Los T_C reconocen las células infectadas por virus a través del TCR. Los antígenos específicos producen la muerte vía perforina y granzima. Las NK utilizan los mismos mecanismos efectores para producir la muerte de la células tumorales e infectadas por virus. Sin embargo, las células NK no requieren estimulación previa ni exhiben memoria. Las NK responden a la *ausencia* de proteínas de clase I.

- ✓ Identifique y compare qué antígenos reconocen las células T_C y las NK.
- ✓ Describa el efector común que utilizan las células citotóxicas.

22.7 Las células T cooperadoras: la respuesta inmunitaria activada

Aquí definiremos las funciones de las T_H y su trabajo en la producción de citocinas que potencian la respuesta inmunitaria. Las T_H son divididas en dos subgrupos, T_H1 y T_H2. Las T_H1 juegan un papel en la potenciación de los macrófagos, y los T_H2 interaccionan con los linfocitos B y estimulan la producción de anticuerpos.

Células T_H1 y activación del macrófago

Los macrófagos juegan un papel fundamental como células presentadoras de antígeno (APCs) tanto en la inmunidad humoral (mediada por anticuerpos) como en la celular. Tal como se ilustra en la Figura 22.11*b*, los macrófagos unen, procesan y presentan el antígeno a las células T_H. Sin embargo, como células fagocíticas que son, los macrófagos también captan y destruyen ciertas células extrañas, y esta capacidad puede ser estimulada por las células Th1. Una propiedad básica de los macrófagos activados es que pueden destruir bacterias intracelulares que habitualmente se multiplicarían. Como hemos advertido (*véase* Sección 22.2), algunas bacterias sobreviven y se multiplican dentro de los macrófagos, mientras que la mayoría de las bacterias que los macrófagos ingieren son destruidas y digeridas. Las bacterias que se multiplican en el interior de los macrófagos incluyen *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae* (agentes etiológicos de la tuberculosis y lepra, respectivamente) y *Listeria monocytogenes* (agente etiológico de la listeriosis (*véase* Sección 29.9). Los animales que reciben una dosis moderada de *M. tuberculosis* son capaces de superar la infección y hacerse inmunes, al desarrollar una respuesta inmune mediada por células T. Las células implicadas son las células T inflamatorias, T_H1. Los macrófagos activados y otros fagocitos no específicos secretan un número de citocinas que incluye IFNγ (interferon gamma), GM-CSF (factor estimulador de granulocitos y monocitos) y TNFα (factor de necrosis tumoral alfa) (Figura 22.12). Resulta sorprendente que dichos animales inmunizados también fagociten y des-

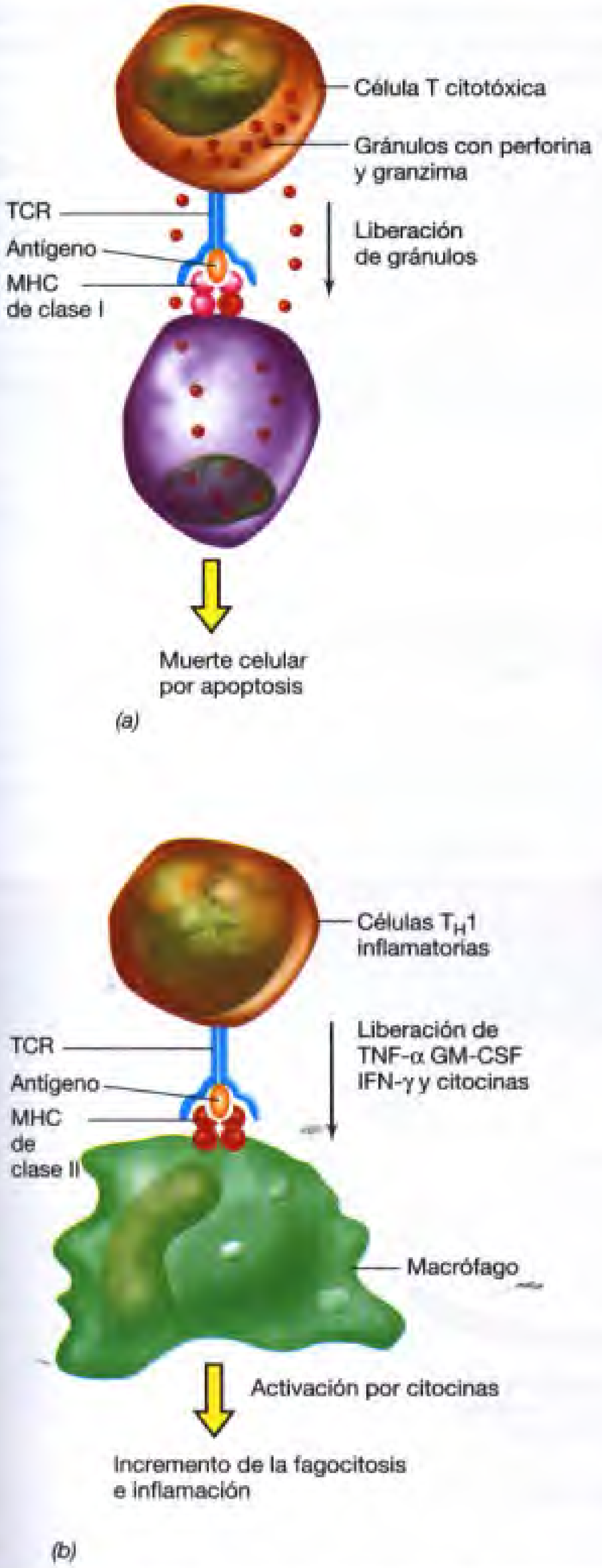

Célula T citotóxica
Gránulos con perforina y granzima
TCR
Antígeno
MHC de clase I
Liberación de gránulos
Muerte celular por apoptosis
(a)
Células T_H1 inflamatorias
TCR
Antígeno
MHC de clase II
Liberación de TNF-α GM-CSF IFN-γ y citocinas
Macrófago
Activación por citocinas
Incremento de la fagocitosis e inflamación
(b)

Figura 22.12 Células T efectoras. (a) Células T citotóxicas o T_C; son activadas por antígenos en el contexto del MHC de clase I. Las T_C responden liberando los gránulos que contienen de perforina y granzima, citoxinas que perforan la célula y causan apoptosis, respectivamente. (b) Células T inflamatorias o T_H1; son activadas por antígenos presentes en macrófagos en el contexto del MHC de clase II. Las T_H1 responden produciendo citocinas que estimulan a los macrófagos que incrementan la capacidad fagocítica y promueven la inflamación.

truyan, con mayor facilidad, organismos no relacionados como *Listeria*, y que pueda demostrarse que los macrófagos en el animal inmunizado hayan sido activados, pudiendo así destruir con más facilidad al invasor.

Los macrófagos no sólo destruyen patógenos extraños, sino que también participan en la destrucción de células extrañas de mamífero. Esto se evidencia en el desarrollo de la inmunidad frente a transplantes, y constituye un problema importante en el transplante de órganos y tejidos de una persona a otra. Los macrófagos destruyen igualmente en algunos casos células tumorales. Éstas contienen determinados antígenos específicos que no aparecen en células normales y los tumores se comportan como injertos impuestos al propio hospedador. Resulta bastante evidente que las células habitualmente son reconocidas y destruidas fundamentalmente por los macrófagos, que son reclutados por citocinas secretadas por células T_H1.

T_H2 y activación de células B

Las T_H2 juegan un papel fundamental en la activación de las células B y en la producción de anticuerpos. Como hemos discutido en la Sección 22.3, las células B fabrican los anticuerpos. ¿De qué manera están los T_H2 implicados? Las células B maduras están rodeadas de anticuerpos incluidos en la membrana que actúan de receptores del antígeno, las células B no producen inmediatamente anticuerpos solubles pero en realidad actúan como células presentadoras de antígeno (APC) e interaccionan con el linfocito T_H2. Más

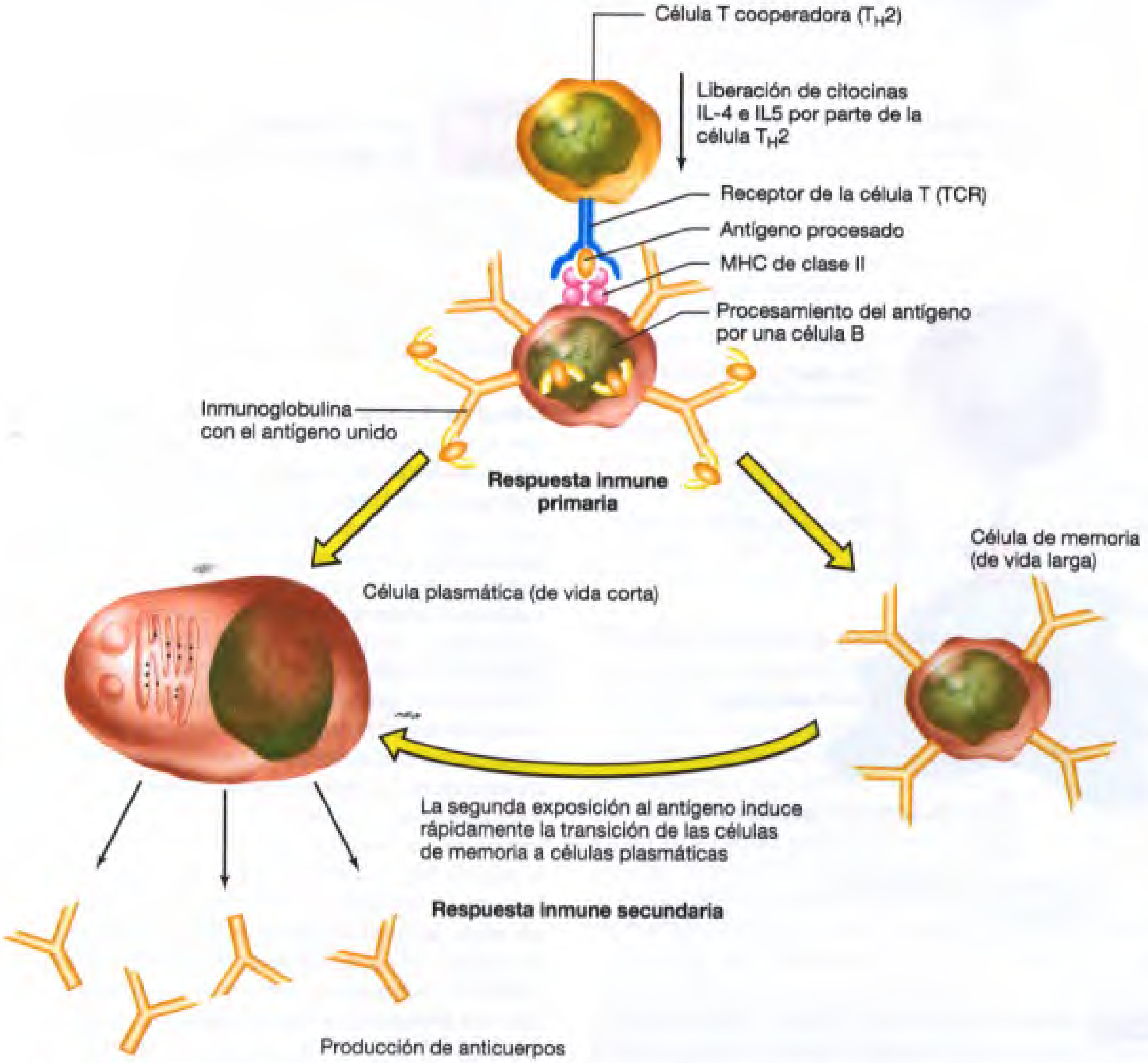

Célula T cooperadora (T_H2)
Liberación de citocinas IL-4 e IL5 por parte de la célula T_H2
Receptor de la célula T (TCR)
Antígeno procesado
MHC de clase II
Procesamiento del antígeno por una célula B
Inmunoglobulina con el antígeno unido
Respuesta inmune primaria
Célula de memoria (de vida larga)
Célula plasmática (de vida corta)
La segunda exposición al antígeno induce rápidamente la transición de las células de memoria a células plasmáticas
Respuesta inmune secundaria
Producción de anticuerpos

Figura 22.13 Interacción célula T-célula B y producción de anticuerpos. La célula B funciona como una célula presentadora de antígeno (APC) y concentra el antígeno con receptores específicos de inmunoglobulina. Tras el procesamiento, el antígeno es presentado a la célula T_H2 por una molécula MHC de clase II. La célula T_H2 a su vez envía una señal a la misma célula B para que prolifere y forme células plasmáticas (productoras de anticuerpos) o células de memoria. Después de una posterior exposición al antígeno, parte de las células de memoria se transforman rápidamente en células plasmáticas.

específicamente, unen al antígeno, lo endocitan y lo degrada la célula B. Los péptidos del antígeno degradado son asociados a clase II del MHC a las T_H2 (Figura 22.11*b* y 22.13). Las T_H2 responden produciendo IL4 (interleucina 4) e IL5, citocinas que actúan directamente sobre la célula B. La célula secreta ahora anticuerpos solubles, como discutiremos en la Sección 22.9. Por lo tanto, las T_H2 son cooperadoras que potencian la actividad de los linfocitos B y la producción de anticuerpos.

✓ 22.7 *Revisión de conceptos*

Las células Th1 y Th2 juegan un papel fundamental en la respuesta celular y humoral. Las Th1 y Th2 secretan citocinas lo que estimula a otras células.

- ✓ Describa el papel de las Th1 en la activación de macrófagos.
- ✓ Describa el papel de las Th2 en la activación de las células B.

III ANTICUERPOS E INMUNIDAD

Aquí nos referimos al papel de los anticuerpos y las células B en la inmunidad. Los anticuerpos son importantes componentes que promueven un estado de inmunidad específica del antígeno para los patógenos extracelulares y que combaten las peligrosas proteínas solubles que se denominan toxinas. Después de considerar el aspecto molecular de los anticuerpos, revisaremos la producción de anticuerpos por células B. También incluiremos una discusión sobre los anticuerpos que pueden neutralizar y destruir los antígenos *in vivo*.

22.8 Anticuerpos (inmunoglobulinas)

Las *inmunoglobulinas (anticuerpos)* son moléculas de proteína capaces de combinarse con determinantes antigénicos. Se hallan presentes en el suero y en otros líquidos corporales como las secreciones gástricas y la leche. El suero que contiene anticuerpos específicos de antígeno se denomina habitualmente **antisuero**. Las inmunoglobulinas (Igs) pueden dividirse en cinco clases principales basándose en sus propiedades físicas, químicas e inmunológicas: **IgG, IgA, IgM, IgD** e **IgE** (Tabla 22.2). En la mayoría de los individuos humanos, la inmunoglobulina de clase IgG supone el 80% del suero y por tanto la estudiaremos en detalle.

Estructura de la inmunoglobulina IgG

La inmunoglobulina G (IgG) es el anticuerpo circulante más abundante y además es un buen modelo estructural.

TABLA 22.2 Propiedades de las inmunoglobulinas humanas

Clase/ cadena H[a]	Peso molecular/ fórmula[b]	Concentración sérica (mg/ml)	Sitios de unión al antígeno	Propiedades	Distribución
IgG γ	150 000 2(H + L)	13,85	2	Principal anticuerpo circulante; existen cuatro subclases: IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4. IgG_1 e IgG_3 unen el complemento	Fluido extracelular; sangre y linfa; atraviesa la placenta
IgM μ	970 000 (pentámero) 5[2(H + L)] + J	1,5	10	Primer anticuerpo postinmunización; fuerte unión al complemento	Sangre y linfa; superficie de linfocitos B (como monómero)
	175 000 (monómero) 2(H + L)	0	2		
IgA α	150 000 2(H + L)	3,5	2	Importante anticuerpo circulante	Secreciones (saliva, calostro, suero, y fluidos celulares y sanguíneos); presente en en el suero en forma de monómero y como dímero en las secreciones
	385 000 (forma secretora) 5[2(H + L)] + J + SC	0,05	4	Principal anticuerpo de las secreciones	
IgD δ	180 000 2(H + L)	0,03	2	Anticuerpo circulante presente en menor cantidad	Sangre y linfa; superficie de linfocitos B
IgE ϵ	190 000 2(H + L)	0,00005	2	Participa en las reacciones alérgicas; contiene un fragmento (C_H4) capaz de unirse a las células cebadas (mastocitos)	Solamente en sangre y linfa; capaz de unirse a las células cebadas (mastocitos)

[a] Todas las inmunoglobulinas pueden tener λ o κ, pero no las dos.

[b] Basado en el número de las cadenas pesadas (H) y ligeras (L) por cada molécula funcional. La cadena J es una proteína de unión que se encuentra en suero asociada a la IgM y a la IgA secretora. La cadena SC se encuentra asociada a la IgA secretora. *Véanse* Figuras 22.16, 22.17 y 22.18 para un diagrama de cada inmunoglobulina.

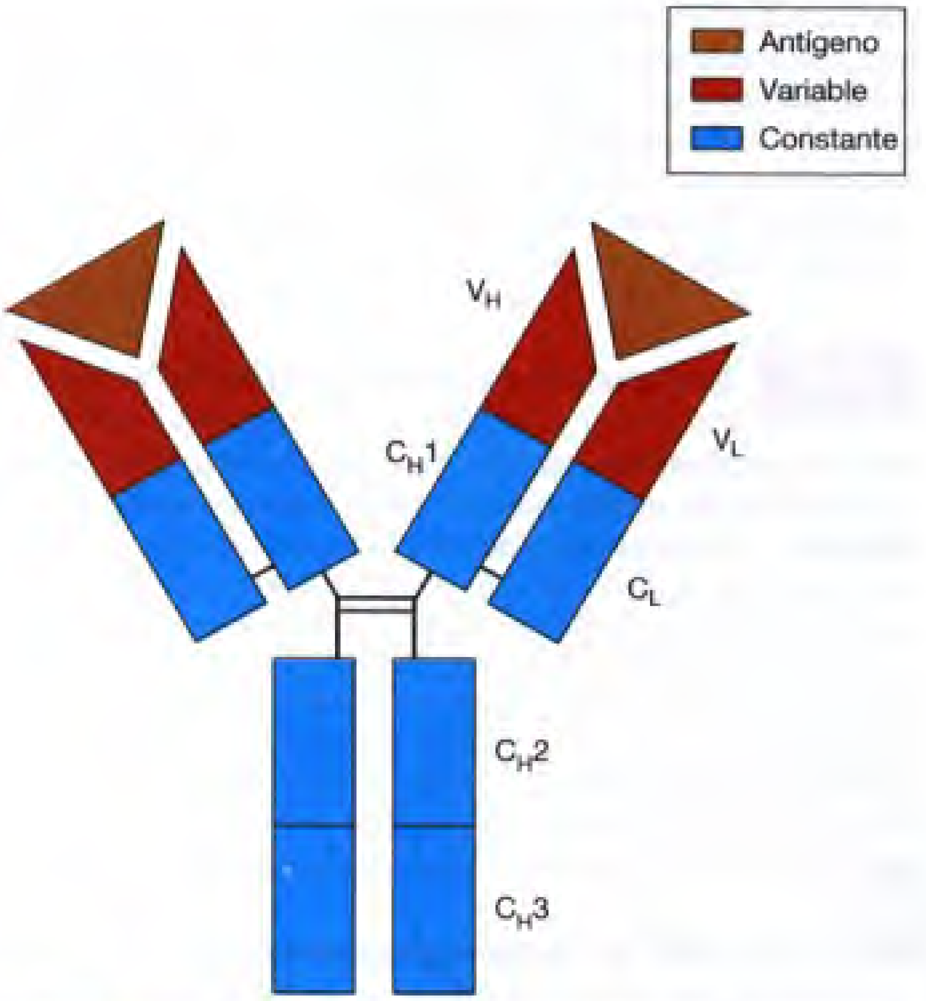


Figura 22.14 Estructura de la inmunoglobulina G (IgG), consta de dos cadenas H (50 000 dalton) y 2 cadenas L (25 000 dalton), con el total de peso molecular de 150 000 dalton. La cadena pesada y la ligera interaccionan para formar el sitio de unión al antígeno. Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras (V_H y V_L) unen al antígeno y muestran secuencias diferentes en cada inmunoglobulina. Los dominios constantes (C_H1, C_H2 y C_H3) son idénticos en todas las proteínas IgG. En su estructura existen puentes disulfuro intra e intercatenarios.

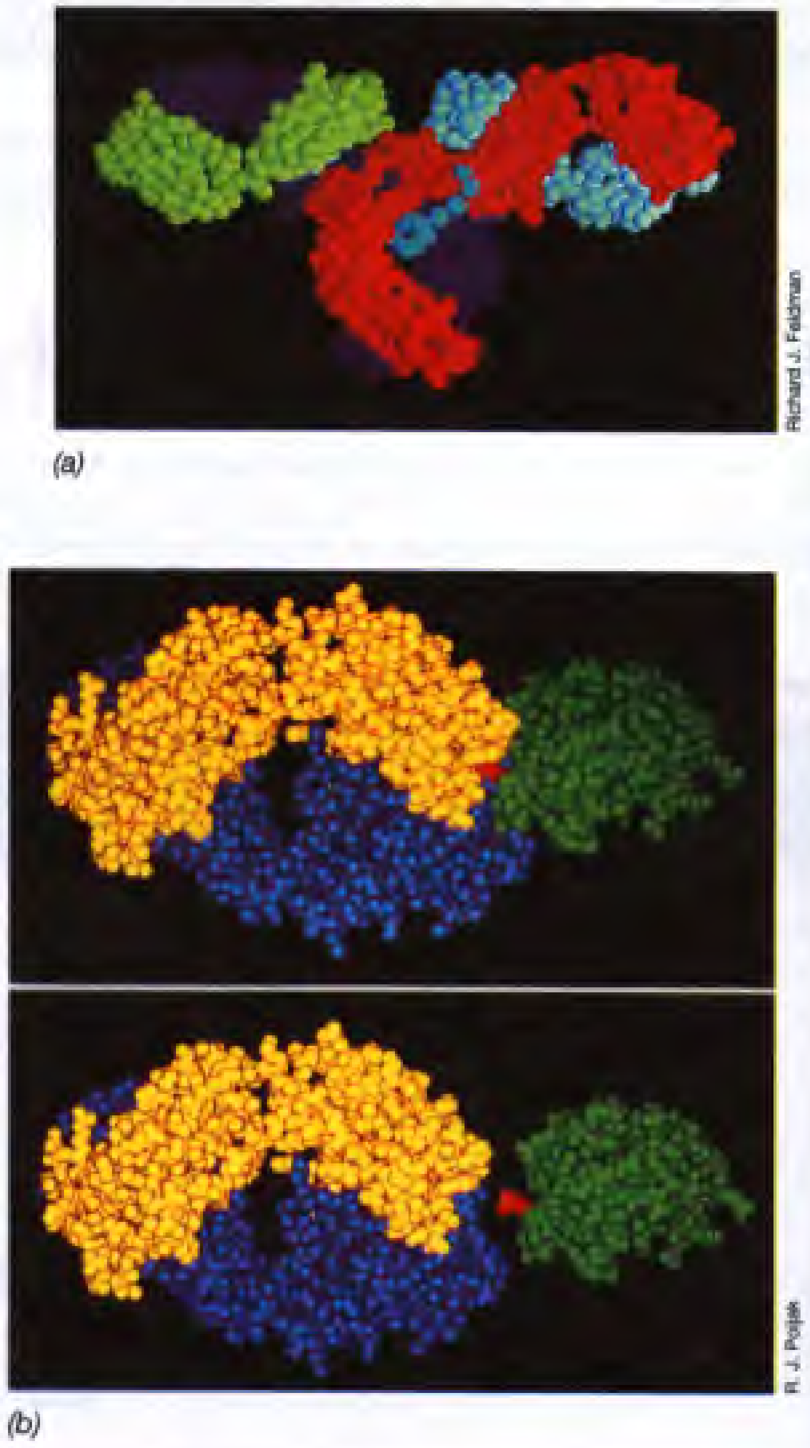
La inmunoglobulina G tiene un peso molecular de unos 150 000 dalton y está compuesta de cuatro cadenas polipeptídicas (Figura 22.14). Existen puentes disulfuro (S-S) intracatenarios e intercatenarios. Las dos cadenas ligeras (cortas) son idénticas en su secuencia de aminoácidos (25 000 dalton), y lo mismo ocurre con las dos cadenas pesadas (largas, 50 000 dalton). Cada cadena ligera posee unos 220 aminoácidos y cada cadena pesada, unos 440 aminoácidos. Una cadena funcional de IgG contiene dos uniones al antígeno, cada sitio de unión posee un elemento en la cadena ligera y otro en la cadena pesada. Por lo tanto, los anticuerpos son bivalentes y se unen a dos epítopos idénticos.

Cadenas ligeras de IgG

Todas las cadenas ligeras de IgG contienen dos dominios de aminoácidos de igual tamaño (Figura 22.14). El extremo amino-terminal (*dominio variable*) se diferencia en cada anticuerpo. La región variable es la que se une al antígeno. Por el contrario, el dominio constante (extremo carboxiterminal), es un dominio constante, por lo tanto no difiere en las cadenas ligeras del mismo tipo.

Cadenas pesadas de IgG

Todas las cadenas pesadas de IgG contienen cuatro regiones aminoacídicas, una variable y tres constantes (se llaman *dominios variables* y *constantes*, respectivamente, de aproximadamente 110 aminoácidos cada uno). De una forma semejante a lo que sucede en la cadena ligera, todas las inmunoglobulinas de la clase IgG poseen una porción de su cadena pesada (los tres dominios carboxiterminales) en los que la secuencia aminoacídica entre las distintas moléculas de IgG es idéntica, dependiendo de la clase del anticuerpo.



Richard J. Feldman

R. J. Poljak

Figura 22.15 Estructura de la inmunoglobulina y sitio de unión al antígeno. (a) Visión tridimensional de la inmunoglobulina IgG. En rojo y azul marino se muestran las cadenas pesadas, y en verde y azul claro las cadenas ligeras. (b) Estructura de combinación del antígeno y la inmunoglobulina. El antígeno (lisozima) está en verde. La región variable de la cadena pesada está mostrada en azul y la cadena ligera en amarillo. El aminoácido mostrado en rojo es el residuo de glutamina de la lisozima. El residuo de glutamina de la lisozima se adentra en una agujero de la inmunoglobulina, pero la unión se refuerza por el contacto de múltiples residuos de la inmunoglobulina y el antígeno. Con permiso de *Science* 233: 747 (1986) © AAAS.

Sitio de unión al antígeno

El lugar de unión del antígeno de IgG y de otras inmunoglubinas se forma mediante la interacción cooperativa entre regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera (Figura 22.15). La región variable de ambas cadenas interacciona para formar un anclaje molecular que se une fuertemente al antígeno, pero no es una unión covalente. La fuerza de esta unión se denomina afinidad del anticuerpo. Un anticuerpo que se une con alta afinidad al antígeno, interacciona fuertemente y es unido con firmeza por el anticuerpo.

Cada individuo con un sistema inmunitario funcional es capaz de reconocer y unir innumerables antígenos; cada antígeno es reconocido por el único sitio de unión al mismo. Para acomodarse a todos los posibles antígenos un individuo puede producir más 1 000 000 000 de anticuerpos diferentes. ¿Cómo se genera la diversidad en el sitio de unión? Como discutiremos en la sección siguiente, los anticuerpos son creados por recombinación aleatoria y mutación, con más de 300 genes que codifican las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras. Las células B que producen anticuerpos nuevos son seleccionados por interacciones con el antígeno (*véase* Sección 23.5).

Otras clases de inmunoglobulinas

¿En qué se diferencia la IgG de otras clases de inmunoglobulinas? La región *constante* de la cadena pesada de una determinada inmunoglobulina define su clase y puede tener una de las siguientes cinco secuencias de aminoácidos: gamma (γ), alfa (α), mu (μ), delta (δ) o épsilon (ϵ). Estas secuencias constituyen las tres cuartas partes del extremo carboxiterminal de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas de las clases IgG, IgA y IgD, y los cuatro quintos de la cadena pesada de IgM e IgE (Figura 22.16). Por ejemplo, todos los anticuerpos de la clase IgM contienen aminoácidos en la región constante de su cadena pesada, que representa la secuencia *mu*. No es infrecuente, en una respuesta inmune típica, observar la producción de anticuerpos de dos clases diferentes frente al mismo determinante antigénico, normalmente IgM e IgG. La cadena variable (sitio de unión al antígeno) de ambas cadenas IgM e IgG son idénticas, pero las cadenas constantes son diferentes, con IgM expresando los determinantes de mu y la IgG expresando los determinantes de la cadena gamma.

La estructura de la **inmunoglobulina M** (IgM) aparece en la Figura 22.17. Habitualmente se encuentra en forma de un agregado de cinco moléculas de inmunoglobulina unidas a través de péptidos cortos denominados *cadenas J* (al menos tiene que haber una cadena J). Todas las cadenas

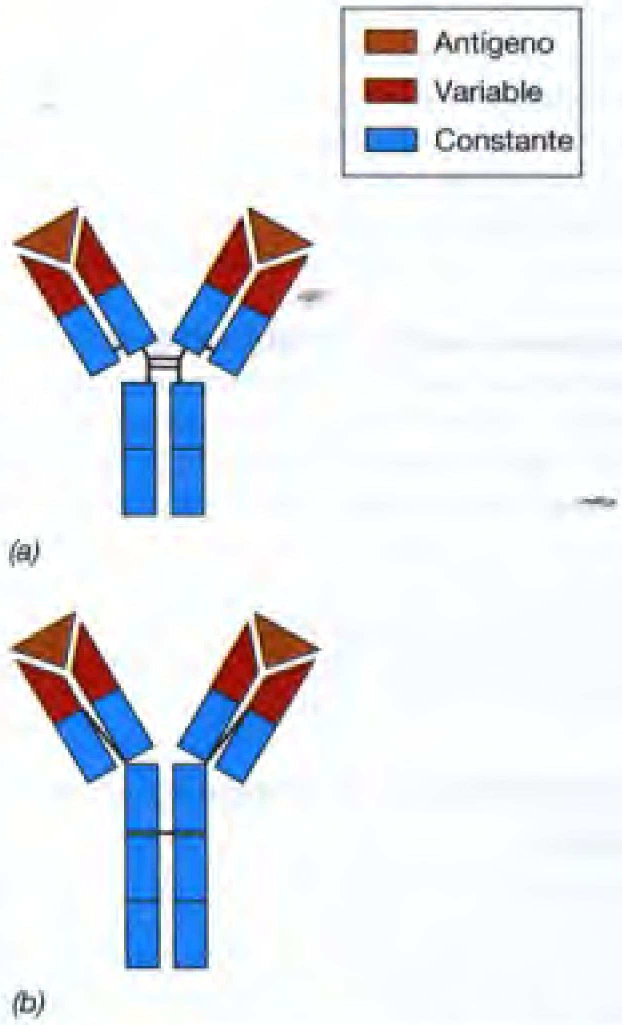


Figura 22.16 Clases de inmunoglobulina. Todas las clases de inmunoglobulina tienen una VH y VL, dominios en rojo, que unen al antígeno (marrón). (a) IgG, IgA e IgD tienen tres dominios constantes (azul). (b) IgM e IgE cada una de ellas tiene cuatro dominios constantes.

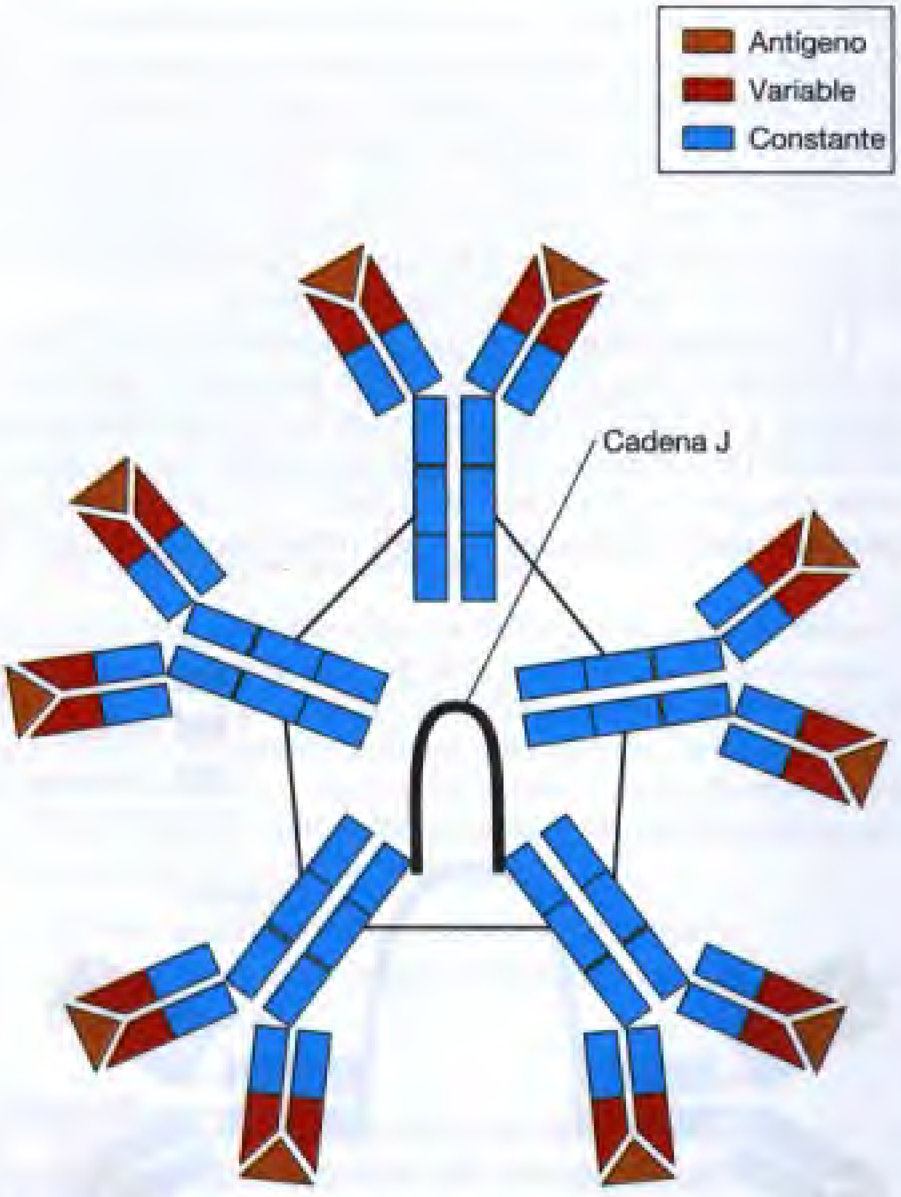


Figura 22.17 La inmunoglobulina M. La inmunoglobulina M (IgM) se encuentra en suero y consta de cinco moléculas (un pentámero) que se unen covalentemente entre sí mediante puentes disulfuro y la cadena J. Como es pentámero, existen disponibles 10 sitios de unión para el antígeno, como se muestra.

de Ig M contienen un dominio extra en la región constante (C_H4). La IgM es la primera clase de inmunoglobulina que aparece en una típica respuesta inmune a una infección bacteriana, aunque las inmunoglobulinas de esta clase presentan habitualmente una baja afinidad. A pesar de ello, la molécula pentamérica de IgM con una *valencia* alta aumenta la fuerza de la unión al antígeno; existen 10 sitios de unión disponibles para la interacción con el antígeno (Tabla 22.2 y Figura 22.17). El término *avidez* se utiliza para describir la *fuerza de unión* de las moléculas multivalentes; de ahí que se diga que la IgM tiene una *baja* afinidad pero una avidez *elevada*. La IgM tiene un porcentaje en el suero del 10%. La IgM también se encuentra en monómero en la superficie de los linfocitos B, donde se une al antígeno.

La **inmunoglobulina A** (IgA) es una forma dimérica (Figura 22.18) presente en las secreciones. La IgA se halla en saliva, lágrimas, leche materna y calostro, secreciones gastrointestinales y secreciones mucosas de los tractos respiratorio y genitourinario. Las superficies mucosas del cuerpo suman en total unos 400 m^2. Todas estas superficies mucosas se asocian con los ganglios linfáticos del MALT (tejido linfático asociado a mucosas) (Figura 22.4), que secretan IgA. El resultado es que la cantidad total de Ig A *secretoria* producida por el organismo es mayor que la cantidad de IgG *sérica*. La IgA es también la segunda Ig en mayor concentración en el suero, pero en forma monomérica (Tabla 22.2). La forma secretoria de IgA tiene una estructura molecular modificada que consiste en una inmunoglobulina dimérica unida a una proteína rica en hidratos de carbono, denominada *pieza secretoria*, y a una cadena peptídica J (Figura 22.18). Estas proteínas contribuyen a estabilizar la inmunoglobulina dimérica y ayudan al transporte de la IgA a través de las membranas y las secreciones.

La **inmunoglobulina E** (IgE) se encuentra en el suero en cantidades muy pequeñas (como promedio, aproximadamente 1 de cada 50 000 moléculas de inmunoglobulinas séricas es IgE). A pesar de su baja concentración, es importante porque las hipersensibilidades de tipo inmediato (alergias) están mediadas por IgE (*véase* Sección 22.12). El peso molecular de una molécula de IgE es significativamente mayor que el de la mayoría de las otras inmunoglobulinas (Tabla 22.2) porque, al igual que la IgM, contiene una región constante adicional (Figura 22.16). Esta región constante adicional sirve para unir la IgE a la superficie de células cebadas (*véase* Figura 22.23), un prerrequisito importante para determinadas reacciones alérgicas.

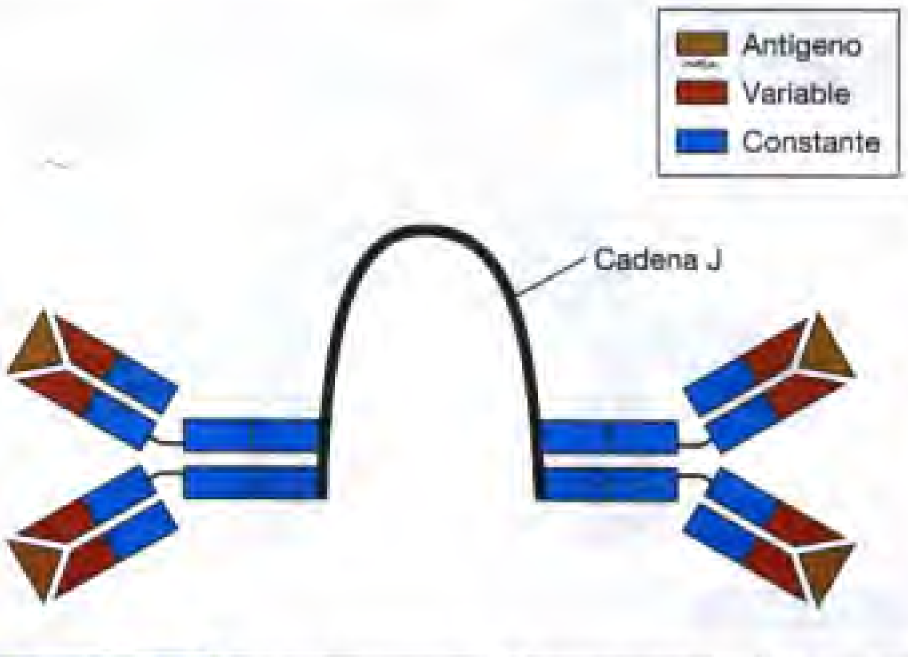


Figura 22.18 Inmunoglobulina A. La inmunoglobulina A secretora (sIg A), la forma secretora de IgA, es una molécula dimérica que consiste en dos moléculas covalentemente unidas una a la otra, vía cadena J.

La **inmunoglobulina D** (IgD) también se encuentra en bajas concentraciones y su función en el conjunto de la respuesta inmune es poco conocida. La IgD abunda en la superficie de las células B productoras de anticuerpos y puede jugar un papel junto a la IgM en la unión del antígeno.

✓ 22.8 Revisión de conceptos

Las inmunoglobulinas (anticuerpos) son proteínas que constan de cuatro cadenas, dos pesadas y dos ligeras. El sitio de unión al antígeno está integrado por las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras. Todas las clases distintas de inmunoglobulinas poseen diferentes características estructurales y funcionales.

- ✓ ¿Qué dominios de las inmunoglobulinas están implicados en la unión al antígeno?
- ✓ ¿Qué características estructurales distinguen las clases de Igs?

22.9 Los linfocitos B y la producción de anticuerpos

La formación de anticuerpos es un proceso complejo. En esta sección, definiremos la naturaleza de una respuesta típica de anticuerpos, especialmente en relación con las interacciones celulares necesarias para producir inmunidad eficaz. En la próxima sección, exploraremos los mecanismos genéticos que se utilizan para generar la diversidad de anticuerpos tras la exposición al antígeno.

Interacciones entre células T y B

La producción de inmunoglobulinas en respuesta a la estimulación por antígenos implica a células T y células B, y la interacción entre diferentes moléculas de la superficie celular (Figura 22.13). Cada paso en la producción de anticuerpos es *muy específico*: la célula B presenta antígeno y, una vez que es procesado el antígeno, la APC lo presenta a la célula Th2 que lo recoge por el TCR. Las células Th2 activadas estimulan a las células B para que produzcan anticuerpos dirigidos frente al antígeno.

Control genético de la producción de anticuerpos

El control genético de la producción de anticuerpos es también un proceso extraordinariamente complejo. Un individuo puede ser capaz de fabricar innumerables moléculas de anticuerpos estructuralmente distintas. Solamente se necesitan relativamente pocos genes para codificar esta inmensa diversidad de anticuerpos, lo que se debe a un fenómeno conocido como reordenamiento génico y mutación para crear un número grande de inmunoglobulinas. Durante el desarrollo de los linfocitos en la médula ósea, las células B sufren *reordenamientos génicos* y deleciones para finalmente dar lugar a dos unidades de mRNA de la molécula de anticuerpo, una de las cuales codifica para la síntesis de una cadena pesada específica y la otra para una cadena ligera. El número de posibles reordenamientos génicos es suficiente para explicar la diversidad de moléculas de inmunoglobulinas (*véase* Sección 23.5). Durante el desarrollo de células T se producen reordenamientos similares que dan lugar a la diversidad de receptores de células T (*véase* Sección 23.7).

Producción de anticuerpos

Ahora resumiremos los pasos en la producción de anticuerpos, empezando por la introducción del antígeno y terminando por la producción de un anticuerpo específico.

1. Los antígenos son transportados por todo el cuerpo a través de la sangre y el sistema linfático. Los sitios principales donde se localiza el antígeno en el organismo son los ganglios linfáticos, el bazo y el hígado. Sin embargo, los anticuerpos se forman solamente en el bazo y los ganglios linfáticos y el MALT (*véanse* Sección 22.1 y Figura 22.2). Si se inocula el antígeno por vía intravenosa, el bazo es el lugar más importante en la fabricación de anticuerpos. Mientras que cuando la administración es subcutánea, intradérmica e intraperitoneal son los ganglios linfáticos los sitios donde predomina la formación de anticuerpos. Si se introduce el antígeno por vía mucosa, por ejemplo por la boca, es llevado al MALT en el intestino, produciendo específicamente IgA.
2. Después de la primera inoculación del antígeno, las células B se multiplican y se diferencian para formar células plasmáticas y de memoria (Figura 22.13). Las células plasmáticas tienen una vida media corta (menos de una semana), pero producen y secretan grandes cantidades de IgM en la **respuesta primaria de anticuerpos** (Figura 22.19). Hay un periodo de latencia antes de que aparezca el primer anticuerpo en sangre, seguido de un incremento progresivo en el título del anticuerpo (cantidad de anticuerpo producido) y después una ligera caída de la producción de anticuerpo.
3. Las células de memoria son células de vida muy larga y pueden vivir varios años. Tras la reexposición al estímulo antigénico inicial, las células de memoria necesitan la cooperación de las células T, luego se transforman en células plasmáticas y comienzan a secretar anticuerpos del tipo IgG. El título aumenta rápidamente hasta un pico de 10 a 100 veces sobre el nivel de la primera exposición. Este importante incremento en el título de anticuerpos se conoce como **respuesta secundaria de anticuerpos** (Figura 22.19). La respuesta secundaria se explica por la memoria inmunológica y da lugar a una producción rápida y más abundante de anticuerpos comparada con la respuesta primaria. Una respuesta secundaria implica habitualmente un cambio en la clase de anticuerpo, casi siempre de IgM a IgG, este fenómeno se denomina *cambio de clase* (Figura 22.19)

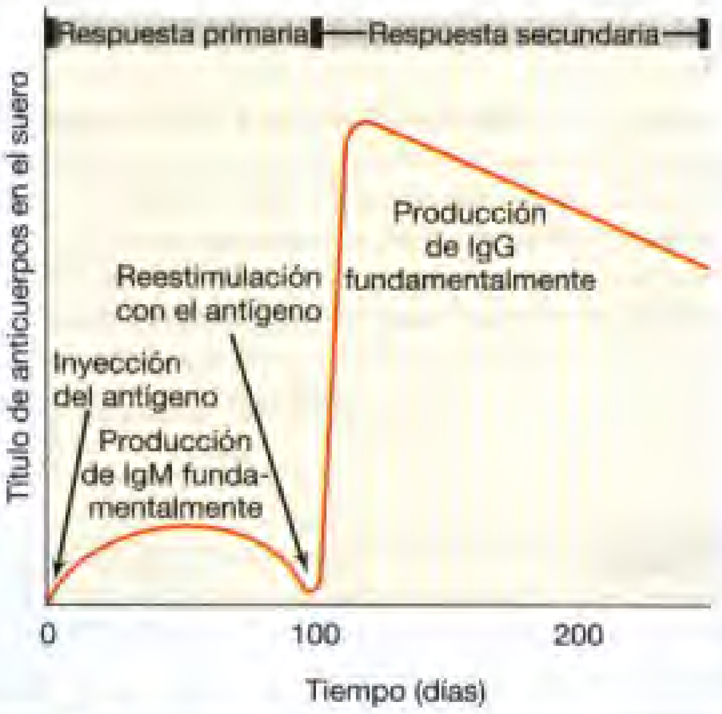


Figura 22.19 Respuestas primaria y secundaria de anticuerpos. El antígeno se inyecta en el día 0 y en el 100 se produce la respuesta secundaria. La respuesta secundaria, también llamada respuesta de empuje, puede ser diez veces mayor que la respuesta primaria. Nótese el cambio de clase de IgM a IgG.

4. Con el tiempo, el título vuelve a disminuir, si bien exposiciones ulteriores al mismo antígeno pueden volver a elevarlo, causando una respuesta secundaria. Esta respuesta secundaria es el fundamento de la técnica de la vacunación conocida como «dosis de refuerzo» (por ejemplo, las dosis anuales de refuerzo de rabia que se administran a los animales domésticos), cuyo objeto es mantener altos niveles de anticuerpos circulantes específicos frente a un antígeno determinado, lo que conlleva protección para determinadas enfermedades infecciosas (*véase* Sección 22.11).

✓ *22.9 Revisión de conceptos*

La producción de anticuerpos se inicia por el contacto del antígeno a través de una APC con una célula TH2 antígeno-específica. A su vez, la célula TH2 envía señales para que la célula B específica de antígeno produzca anticuerpos. Las células B activadas se mantienen durante años como células de memoria y producen grandes cantidades (títulos elevados) de anticuerpos tras una nueva exposición al antígeno.

✓ ¿Cómo las células b pueden actuar de APCs?

✓ ¿De qué manera las células TH2 activan las células B antígeno-específicas?

22.10 Complemento, anticuerpos y destrucción de patógenos

El **complemento** juega un papel importante en la respuesta inmunitaria. Interacciona con complejos específicos antígeno-anticuerpo para poner en marcha reacciones. Varias proteínas que forman el complemento interaccionan de forma secuencial causando la lisis de las células bacterianas.

Las proteínas del complemento también potencian la fagocitosis y la destrucción del antígeno.

Activación del complemento y daño celular

El complemento está formado por un número de proteínas muchas de las cuales tienen actividad enzimática. Estas proteínas interaccionan de una manera secuencial y ordenada con las células bacterianas u otro material extraño, provocando lisis o pérdida de los componentes celulares como resultado del daño a la membrana celular. Estas enzimas se encuentran en niveles comparables en todos los individuos. De hecho, una de las principales funciones de un anticuerpo es reconocer las células invasoras y activar el complemento para el ataque. Una gran variedad de anticuerpos, cada uno específico de un solo antígeno, es capaz de reclutar la maquinaria del complemento; el sistema inmunitario no necesita enzimas individuales para atacar cada agente invasor.

El sistema del complemento consta de proteínas denominadas C1, C2, C3 y así sucesivamente. La activación del complemento tiene lugar sólo con anticuerpos de las clases IgG e IgM (*véase* Tabla 22.2). Cuando dichos anticuerpos se combinan con sus respectivos antígenos, sobre todo en la

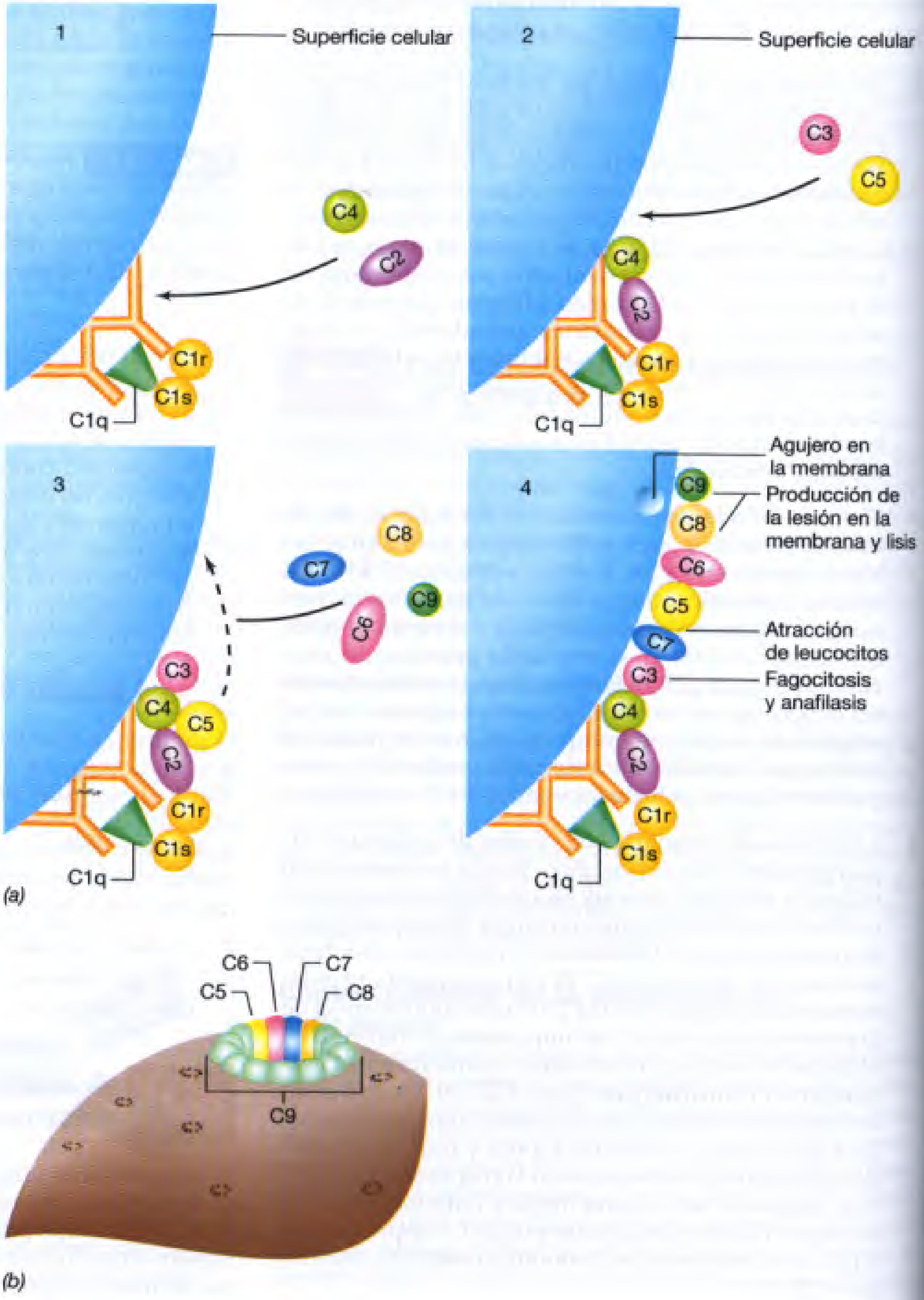

1
Superficie celular
C4
C2
C1r
C1s
C1q
2
Superficie celular
C3
C5
C4
C2
C1r
C1s
C1q
3
C8
C7
C9
C6
C3
C4
C5
C2
C1r
C1s
C1q
(a)
4
Agujero en la membrana
C9
C8
Producción de la lesión en la membrana y lisis
C6
C5
Atracción de leucocitos
C7
C3
Fagocitosis y anafilasis
C4
C2
C1r
C1s
C1q
C6
C7
C5
C8
C9
(b)

Figura 22.20 El sistema del complemento. (a) Secuencia, orientación y actividad de los distintos componentes que interaccionan para lisar una célula. Panel 1: fijación de la unidad de reconocimiento del anticuerpo C1q y de otras proteínas C1; panel 2: complejo C4-C2; panel 3: complejo C4-C2-C3-C5 (tras la activación de la unidad C5, ésta se sitúa en un sitio adyacente de la membrana); panel 4: unión de C6, C7, C8 y C9, responsables de la lesión en la membrana. (b) Visión tridimensional del agujero formado por los componentes C5 a C9 del complemento.

superficie celular, los anticuerpos adquieren conformaciones nuevas en sus dominios de regiones constantes que les permiten fijarse (unirse) a proteínas del complemento presente (Figura 22.20). Las proteínas del complemento actúan en cascada, de tal manera que la activación de un componente origina la activación del siguiente. En resumen, las fases son: (1) unión del anticuerpo al antígeno (iniciación); (2) reconocimiento del complejo antígeno-anticuerpo por C1; (3) unión de C4-C2 a un lugar próximo de la membrana; (4) activación de C3; (5) formación del complejo C5-C6-C7 en la membrana; y (6) formación del complejo C8-C9, causando la lisis celular (Figura 22.21).

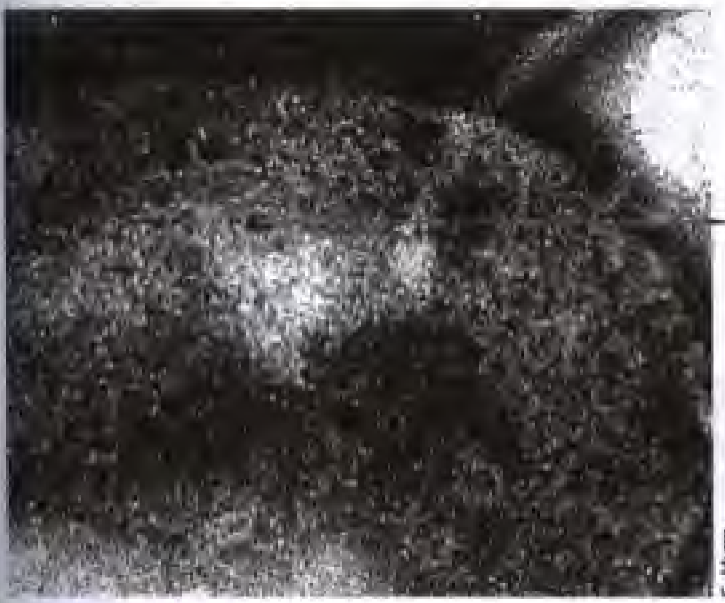
Algunos productos de la activación del complemento son poderosos factores quimiotácticos, llamados anafilotoxinas porque originan inflamación en el sitio de la deposición del complemento (*véase* Sección 22.13). Las reacciones del complemento C3 inducen una atracción quimiotáctica de fagocitos y la fagocitosis tras la opsonización. Reacciones incluidas en C5 promueven la atracción de las células T y la liberación de citocinas.

El complemento es necesario para la acción bactericida y lítica de los anticuerpos frente a las bacterias Gram negativas. Es interesante destacar que las bacterias Gram positivas no son destruidas por anticuerpos específicos, ya sea en presencia o en ausencia del complemento, si bien las bacterias Gram positivas son opsonizadas de forma específica en presencia de anticuerpos y luego destruidas.

Opsonización

Cuando el anticuerpo reacciona con el antígeno en la superficie de la célula, la célula es más susceptible de ser fagocitada. Cuando hay un complejo de antígeno y anticuerpo será aún más susceptible de ser fagocitada, esto es porque los fagocitos incluyendo macrófagos y células B tienen receptores de anticuerpos y receptores de C3 (C3R). Estos receptores se unen al dominio constante de los anticuerpos y al componente de C3 de la proteína del complemento, respectivamente. Normalmente el proceso fagocítico se acentúa con la unión del anticuerpo y se amplifica aún más con la unión del complemento (C3). La potenciación de la fagocitosis por el complemento se llama *opsonización*.

Las bacterias Gram positivas se opsonizan de esta manera promoviendo la fagocitosis y la destrucción del patógeno. Pero en el caso de las bacterias Gram negativas, las bacterias a través de sus antígenos de superficie deben unir anticuerpos, unir complemento y promover la opsonización.



E. Munn

Figura 22.21 Micrografía electrónica de una preparación por tinción negativa de *Salmonella paratyphi*, que muestra los agujeros creados en la envoltura celular como resultado de la reacción que implica a antígenos de envoltura, anticuerpos específicos y complemento.

✓ 22.10 Revisión de conceptos

La cascada de proteínas del complemento representa un mecanismo inespecífico para la destrucción celular y la opsonización. Está desencadenada por interacciones inmunes mediadas por anticuerpos específicos y constituye un componente fundamental de la defensa del hospedador.

- ✓ Identifique las clases de inmunoglobulinas que fijan el complemento.
- ✓ ¿Qué componentes del complemento son necesarios para una opsonización?
- ✓ ¿Qué componentes del complemento son necesarios para una lisis celular completa?

IV LA RESPUESTA INMUNITARIA PARA PREVENIR LA ENFERMEDAD

Aquí describiremos la respuesta inmunitaria para prevenir las enfermedades infecciosas, bien sea a través de inmunidad natural o a través de inmunidad adquirida. Luego describiremos los avances técnicos para producir inmunógenos, que pueden suponer una revolución para inducir respuestas específicas frente a una variedad de patógenos y sus productos.

22.11 Inmunidad para prevenir la enfermedad

El papel más importante de la respuesta inmune en el organismo es la protección del hospedador frente a las consecuencias de una infección. La importancia de los anticuerpos en la resistencia a la enfermedad se muestra de una manera muy clara en los individuos con el trastorno genético **agammaglobulinemia**, en la que no se producen anticuerpos por deficiencia de células B. Dichos individuos son anormalmente sensibles a las infecciones, especialmente a aquéllas provocadas por bacterias. La falta general de una respuesta de anticuerpos se observa también en los individuos que padecen el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA); sin embargo, en este caso el problema no se debe a un defecto de células B. Los enfermos de SIDA sufren, por el contrario, una pérdida funcional casi total de las células CD4 (fundamentalmente T_H) (*véase* Sección 22.7). La importancia crucial de las células T en la generación de inmunidad resulta evidente en los enfermos de SIDA: la incapacidad de orquestar una respuesta inmune lleva a la muerte de estos enfermos por infecciones (*véase* Sección 26.14).

La inducción artificial de inmunidad específica antiinfecciosa representó, ciertamente, uno de los primeros triunfos y fue una de las contribuciones más sobresalientes de la microbiología al tratamiento y la prevención de las enfermedades infecciosas. Un animal o un ser humano puede adquirir inmunidad a una enfermedad de varias maneras: (1) El individuo puede adquirir la infección y desarrollar inmunidad. Ésta es una **inmunidad activa natural**, porque la inmunización ha sido el resultado natural de una infección y el individuo infectado generó una respuesta inmune. (2) Se puede administrar al individuo inyecciones de un antígeno que se sepa que induce la producción de anticuerpos, se trata de un tipo de inmunidad denominada **inmunidad activa artificial** porque el individuo en cuestión produce anticuerpos, como consecuencia de la inyección del antígeno. Este proceso se denomina vacunación pero, propiamente, el término es inmunización. (3) Existe un método alternativo que consiste en que el individuo reciba inyecciones de un antisuero obtenido de otro individuo que previamente fabricó anticuerpos contra ese antígeno. Se habla entonces de **inmunidad artificial pasiva** pues el individuo que ha recibido los anticuerpos no ha tomado parte activa en el proceso de fabricación de los anticuerpos. (4) Por último, también puede darse la llamada **inmunidad natural pasiva**. Durante varios meses después del nacimiento, los recién nacidos conservan anticuerpos tipo IgG, que han recibido de la madre en la etapa embrionaria. Estos anticuerpos adquiridos antes del nacimiento a través de la placenta suponen una protección valiosa frente a la enfermedad mientras se produce la maduración del sistema inmune del recién nacido. En la Tabla 22.3 se cotejan la inmunidad activa y la pasiva.

La inmunidad *activa* produce cambios fundamentales en el hospedador: las células inmunitarias producen grandes cantidades de anticuerpos (Igs) y células. Una segunda dosis produce una respuesta secundaria de título elevado y más rápida (*véase* Figura 22.19). La inmunidad activa generalmente dura de por vida. Un individuo inmunizado *pasivamente* nunca posee más anticuerpos que los que recibió en la inyección inicial, y estos anticuerpos van desapareciendo gradualmente del organismo; además, una inoculación posterior con la dosis del antígeno no desencadena una respuesta secundaria. Habitualmente la inmunidad activa se utiliza como medida *profiláctica* con el fin de proteger a una persona contra futuros ataques de un patógeno. La inmunidad pasiva es generalmente *terapéutica* y su finalidad es curar a una persona que padece una enfermedad. Por ejemplo, el toxoide tetánico (*véase* la próxima sección) inmuniza activamente a un individuo frente a la toxina del *Clostridium tetani*, mientras que el antisuero tetánico (antitoxina) (*véase* más adelante) se administra para inmunizar pasivamente a un individuo sospechoso de haber entrado en contacto con la exotoxina del *C. tetani*.

Inmunización

El material utilizado para inducir inmunidad artificial, el antígeno o la mezcla de antígenos, es conocido como **vacuna** o **inmunógeno**, y el proceso se conoce como **inmunización**. Cuando se requiere una inmunización contra el microorganismo completo, puede conllevar riesgos. Los microorganismos peligrosos deben ser alterados para prevenir la infección. Para matar los organismos habitualmente se usan agentes del tipo del formaldehído, el fenol o calor. Después se inyectan las células muertas, como inmunógeno. El tratamiento con formaldehído se emplea también para la inactivación de virus en la preparación de algunas vacunas, como la *vacuna antipolio de tipo Salk*. En las enfermedades causadas por toxinas la forma activa de la toxina no es utilizada como inmunógeno. Muchas exotoxinas pueden ser modificadas químicamente de tal suerte que retienen su antigenicidad pero ya no son tóxicas. Esta toxina modificada se denomina **toxoide.** Los toxoides, por lo general, no son antígenos tan eficaces como las exotoxinas originales pero pueden administrarse a dosis altas y con seguridad.

La inmunización con células o virus vivos es generalmente más eficaz que la que utiliza material muerto o inactivado. Con frecuencia es posible aislar una cepa mutante de un patógeno que ha perdido su virulencia pero que todavía conserva los antígenos inmunizantes; las cepas de este tipo se denominan **cepas atenuadas** (Sección 21.8).

En la Tabla 22.4 se resumen las vacunas disponibles para su utilización en el hombre. Las vacunas de tipo vírico son vacunas atenuadas. Las vacunas muertas de los virus producen inmunidad a corto plazo, sin la deseable actuación a largo plazo. Las vacunas bacterianas son normalmente muertas. Las vacunas muertas proporcionan inmunidad por largo tiempo. Las vacunas atenuadas pueden ser más efectivas (y en el caso de muchos virus son necesarias), pero las cepas atenuadas son difíciles de seleccionar, estandarizar y mantener. Las vacunas vivas tiene un tiempo limitado de almacenaje, y requieren refrigeración y condiciones adecuadas.

TABLA 22.3 Comparación entre inmunidad activa y pasiva

Inmunidad activa	Inmunidad pasiva
Exposición al antígeno; se logra mediante inyección del antígeno	No exposición al antígeno; se logra mediante inyección de anticuerpos específicos y células T que reaccionan contra el antígeno
Los individuos consiguen la inmunidad	Los anticuerpos se fabrican en otro hospedador
Sistema inmune activado por el antígeno; memoria inmunológica eficaz	No se activa el sistema inmune; no existe memoria inmunológica
El título de anticuerpos puede permanecer elevado mediante dosis posteriores de recuerdo	El título de anticuerpos decae gradualmente
El estado de inmunidad tarda semanas	El estado de inmunidad se desarrolla inmediatamente

TABLA 22.4 Vacunas disponibles para enfermedades infecciosas en el hombre

Enfermedad	Tipo de vacuna empleada
Enfermedades bacterianas	
Carbunco (Antrax)	Toxoide
Difteria	Toxoide
Tétanos	Toxoide
Tosferina	Bacterias muertas (*Bordetella pertussis*) o proteínas acelulares
Fiebre tifoidea	Bacterias muertas (*Salmonella typhi*)
Fiebre paratifoidea	Bacterias muertas (*Salmonella paratyphi*)
Cólera	Células muertas o extractos celulares (*Vibrio cholerae*)
Peste	Células muertas o extractos celulares (*Yersinia pestis*)
Tuberculosis	Cepa atenuada de *Mycobacterium tuberculosis* (BCG)
Meningitis	Polisacárido purificado de *Neisseria meningitidis*
Neumonía bacteriana	Polisacárido purificado de *Streptococcus pneumoniae*
Tifus exantemático	Bacterias muertas (*Rickettsia prowazekii*)
Meningitis por *Haemophilus influenzae*	Vacuna conjugada (polisacárido de *Haemophilus influenzae* conjugado a proteína)
Enfermedad de Lyme	Proteína de membrana recombinante de *Borrelia burgdorferi*
Enfermedades víricas	
Fiebre amarilla	Virus atenuado
Sarampión	Virus atenuado
Parotiditis	Virus atenuado
Rubeola	Virus atenuado
Poliomielitis	Virus atenuado (Sabin) o inactivado (Salk)
Gripe	Virus inactivado
Rabia	Virus inactivado (humano) o atenuado (perros y otros animales)
Viruela	Virus cross-reactivo (vaccinia) (*véase* Sección 16.12)
Hepatitis A	Vacuna de DNA recombinante
Hepatitis B	Vacuna de DNA recombinante o virus inactivado
Varicela	Virus atenuado

La práctica de la inmunización

Los lactantes poseen anticuerpos procedentes de sus madres y de ahí que sean relativamente inmunes a las infecciones durante los primeros 6 meses de vida. Sin embargo, es deseable la inmunización de los lactantes contra las infecciones más importantes, tan pronto como sea posible para que su propia inmunidad *activa* pueda sustituir a la inmunidad *pasiva* que recibieron de su madre. Como se expuso en la Sección 22.8, una sola inyección del antígeno no se sigue de un título alto de anticuerpos; por lo tanto, es deseable utilizar una serie de inyecciones para conseguir un título elevado de anticuerpos. En la Figura 22.22 se muestra un programa de vacunación típico para niños desde el nacimiento a la edad adulta.

La importancia de las técnicas de inmunización en el control de las enfermedades infecciosas está bien establecida. Tras la introducción de un método de inmunización específica en la población, la incidencia de la enfermedad habitualmente disminuye de una manera notable (Figuras 26.14 y 26.17). El grado de inmunización obtenido mediante la vacunación varía enormemente, dependiendo del individuo, y de la calidad y cantidad de la vacuna. Sin embargo, raramente se consigue una inmunidad de por vida por medio de una sola inyección, o incluso tras varias inyecciones, y la población de células inmunes inducida por la inmunización desaparece gradualmente del organismo. Una forma en la que ocurre la estimulación antigénica, incluso en ausencia de inmunización, es a través de infecciones asintomáticas o menores. Una infección natural da lugar a una respuesta de refuerzo rápida que desemboca en un aumento aún mayor de las células productoras de anticuerpos activadas y en la fabricación de anticuerpos. Cuando no existe estimulación antigénica alguna, se desconoce cuánto puede perdurar la inmunidad, variando el periodo inmune con los distintos antígenos. Sin embargo, la inmunidad activa frente a determinadas vacunas como el toxoide tetánico puede durar muchos años.

Los métodos de inmunización no son únicamente beneficiosos para el individuo sino que son eficaces como métodos de salud pública, puesto que la enfermedad se propaga escasamente en una población cuando una gran proporción de sus individuos son inmunes (Sección 25.5)

Inmunidad pasiva

El material que se emplea para inducir inmunidad pasiva (el suero conteniendo los anticuerpos) se denomina *suero* o también *antisuero* o *antitoxina* (este último término se aplica al suero que contiene anticuerpos dirigidos contra una toxina). Los antisueros se obtienen de animales inmunizados de gran tamaño, como son los caballos, o a partir de individuos con elevados títulos (cantidades) de anticuerpos. Se dice que estos individuos son **hiperinmunes**. El antisuero se estandariza para que contenga un título conocido de anticuerpos; debe inocularse un número suficiente de unidades de antisuero para neutralizar cualquier antígeno que pueda estar presente en el organismo. Algunas veces la fracción de inmunoglobulinas del pool de sueros humanos se utiliza como fuente de anticuerpos; contiene una amplia variedad de anticuerpos que las personas normales han fabricado a lo largo de los años por medio de la exposición artificial o natural a distintos antígenos. El conjunto de sueros se utiliza cuando no se dispone de antisueros hiperinmunes.

✓ 22.11 Revisión de conceptos

La inmunidad puede ser activa o pasiva, natural o artificial. La inmunización es una forma artificial de inmunidad activa, empleada generalmente para prevenir las enfermedades infecciosas. La mayoría de los agentes son virus o bacterias, y están atenuados o inactivados, y productos de los organismos.

- ✓ Dé un ejemplo de inmunidad natural pasiva. ¿Cómo la inmunidad pasiva beneficia al individuo inmunizado?
- ✓ Dé un ejemplo de inmunidad activa artificial. ¿Cómo la inmunidad activa artificial beneficia al individuo inmunizado?

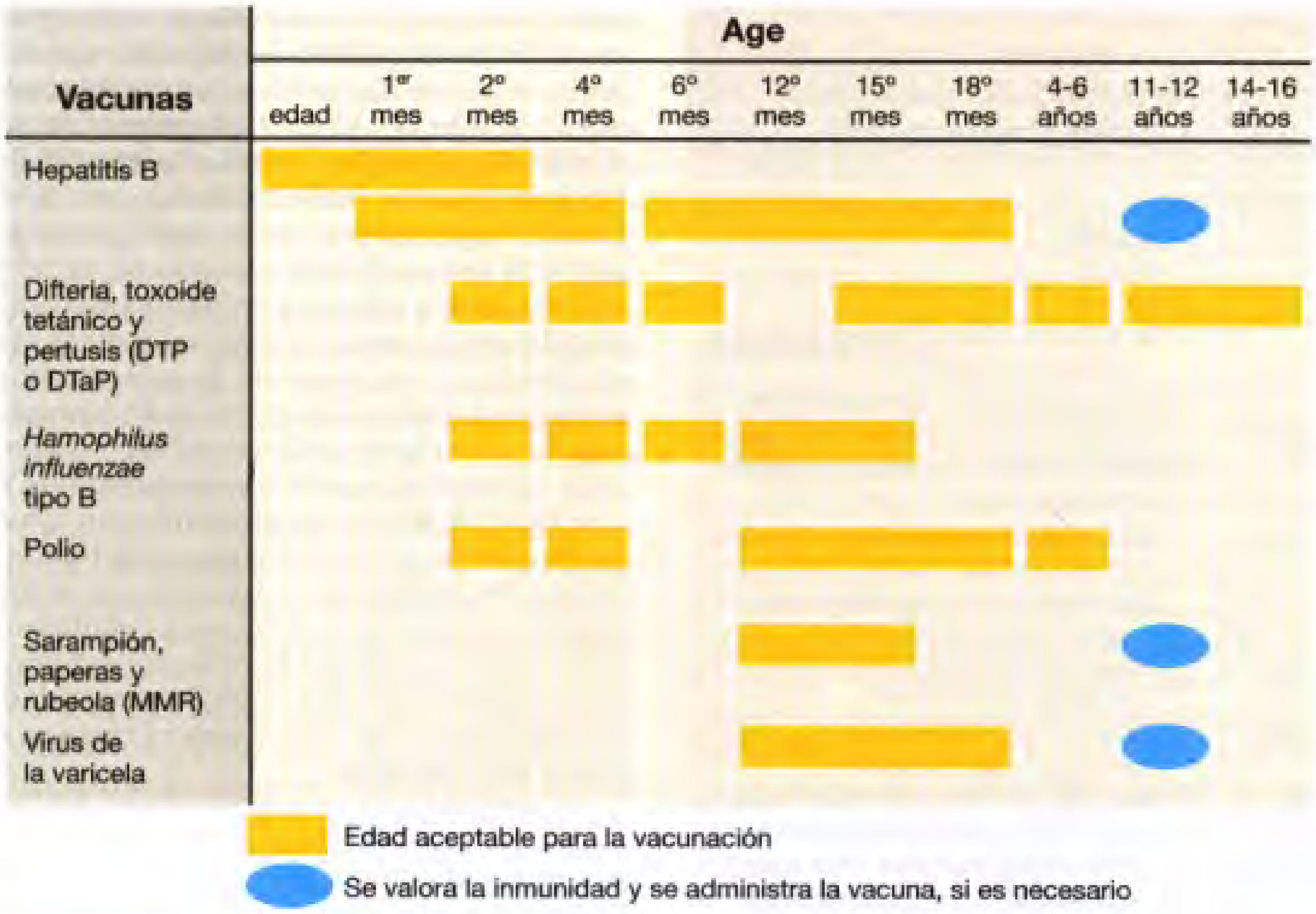


Figura 22.22 Recomendaciones para los niños de Estados Unidos especificadas por los centros de control de enfermedades infecciosas y prevención, de Atlanta, GA. Para pertusis la vacuna DTP contiene células enteras de *Bordetella pertusis*, mientras que la vacuna DtaP es acelular. Las dos vacunas previenen la enfermedad. Para polio, el virus muerto de la polio se debe utilizar en las vacunas de los 2 y 4 meses, mientras que el virus atenuado se usa en el resto de los casos.

22.12 Nuevas estrategias de inmunización

La mayoría de las preparaciones inmunológicas son producidas por los toxoides y los organismos enteros, como se describe en la anterior sección. Sin embargo hay otros métodos para producir antígenos para la inmunización.

Sintéticos y genéticamente modificados como agentes inmunizantes

El mejor método alternativo para el desarrollo de vacunas es el uso de *péptidos sintéticos*. Para hacer una vacuna se puede sintetizar un péptido que corresponda a un epítopo de un agente infeccioso. Por ejemplo, para inmunizar frente a la glosopeda un importante patógeno animal es conocido. Un péptido sintético de 20 aminoácidos constituyendo un determinante antigénico de una proteína ha sido construido y enlazado con el correspondiente portador. Estos anticuerpos neutralizan muy bien el virus de la glosopeda. Sin embargo, esta aproximación experimental tiene un problema grave: la proteína antigénica entera debe ser conocida para hacer una vacuna eficaz. Aunque este requerimiento se cumplía para el virus de la glosopeda, muy pocos patógenos tiene un perfil antigénico tan conocido.

Técnicas de biología molecular igual de sofisticadas pueden utilizarse para hacer vacunas. Por ejemplo, pueden clonarse de muchos virus dentro del virus de la vacuna (vaccinia) y ser expresados. La inoculación con organismos *modificados genéticamente* puede utilizarse como inmunógenos para determinado gen. Dicho procedimiento se denomina *vector de vacuna recombinante*.

Este método depende de la disponibilidad del gen clonado que codifica para el antígeno y de la posibilidad de expresar el gen clonado como proteína antigénica. Un recombinante efectivo para rabia-vacuna ha sido desarrollado para usarlo en animales. Los métodos de la recombinación del DNA para desarrollar vacunas se discuten en la Sección 31.8.

Otra estrategia es el uso de DNA recombinante para producir proteínas como inmunógenos. Para ello, un gen de un patógeno tiene que clonarse en un hospedador adecuado. El hospedador tiene que expresar la proteína recombinante, luego expresará la proteína patógena. La proteína patógena puede recolectarse y usarse para vacunación. Esto es conocido como *vacuna de antígeno recombinante*. Por ejemplo la vacuna para la hepatitis B es un antígeno de superficie del virus (HbsAg) expresado en células de levadura.

Vacunas DNA

Una sencilla manera de vacunar está basada en la expresión de genes clonados en células del hospedador. Plásmidos bacterianos conteniendo DNA clonado son inyectados

TABLA 22.5 Clasificación de las hipersensibilidades

Clasificación	Descripción	Mecanismo inmunitario	Tiempo de latencia	Ejemplos
Tipo I	Inmediata	Sensibilización de IgE de los mastocitos	Minutos	Reacción al veneno de abejas Fiebre del heno
Tipo II	Citotoxina[a]	Interacción de la IgC con antígenos de superficie celular	Horas	Alergia a drogas (penicilina)
Tipo III	Formación de complejos inmunes	Interacción de la IgC con antígeno soluble o circulante	Horas	Lupus eritematoso sistémico (SLE)
Tipo IV	Hipersensibilidad retardada	Células proinflamatorias T_H1	Días	Hiedra venenosa Test de la tuberculina

[a] La mayoría de las enfermedades autoinmunes están causadas por mecanismos del tipo II y III.

intramuscularmente en los animales. Varias semanas después el hospedador responde produciendo células Tc y Th1, y anticuerpos para la proteína incluida en el DNA. Aparentemente el DNA es transcrito y traducido, y se produce la proteína inmunógena, que da lugar a la respuesta inmune. Estos plásmidos se denominan «vacunas DNA».

Las vacunas DNA tiene muchas ventajas sobre otros métodos de inmunización. Por ejemplo, como es inyectado un solo gen, no ocurre como con las vacunas atenuadas, que se puede producir una infección. En segundo lugar, antígenos y determinantes antigénicos pueden utilizarse para promover una respuesta específica, por ejemplo, frente a un antígeno tumoral. Finalmente, esta estrategia es única a la hora de producir respuesta T y producción de anticuerpos. Esto es así porque la proteína antigénica se expresa en la célula hospedadora. Las proteínas son procesadas y presentadas a las células Tc, por los caminos convencionales, resultando la estimulación de las células Tc (*véase* Sección 22.5).

✓ *22.12 Revisión de conceptos*

Los avances en biotecnología y en inmunología han supuesto métodos alternativos para evitar el contacto con los agentes infecciosos y en algunos casos hasta con el antígeno.

✓ Dé dos ejemplos de métodos alternativos de vacunación. ¿Cuál es la ventaja de los métodos alternativos frente a los métodos habituales?

V INMUNIDAD FRENTE A LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS

La respuesta inmunitaria puede causar daño en el hospedador y enfermedad. Las hipersensibilidades son respuestas inmunitarias desapropiadas que pueden causar daño en el hospedador. Los **superantígenos** son proteínas producidas por bacterias y virus que causan una masiva estimulación de las células del sistema inmune causando también daño en el hospedador.

22.13 Alergia, hipersensibilidad y autoinmunidad

Las enfermedades inmunológicas son consecuencia de la reacción lesiva del sistema inmune en el hospedador y se llaman hipersensibilidad. Vamos a tratar de la *hipersensibilidad inmediata*, comúnmente llamada *alergia*, de una respuesta celular anormal que origina la *hipersensibilidad de tipo retardado* y de las *enfermedades autoinmunes*, debidas a que se atacan los propios antígenos.

Hipersensibilidad de tipo inmediato (hipersensibilidad de tipo I)

Esta forma de hipersensibilidad se denomina y ocurre minutos después de la exposición al antígeno. La **hipersensibilidad de tipo inmediato** está medida por *anticuerpos* (Tabla 22.5). Hipersensibilidades de tipo inmediato engloban generalmente las **alergias**. Según el individuo y el antígeno, pueden causar reacciones desde leves a muy graves, incluso que amenacen la vida, por un proceso que se denomina *anafilaxis*. Los antígenos que causan estas hipersensibilidades se llaman *alergenos*.

En el hombre, un 20% de la población padece estos cuadros, incluyendo reacciones alérgicas (*anafilácticas*) a alergenos específicos como pólenes, caspa de animales y otros agentes (Tabla 22.6). En una reacción anafiláctica característica, un antígeno desencadena (tras la primera exposición) la producción de inmunoglobulinas de la clase IgE. A diferencia de las inmunoglobulinas circulantes de la clase IgG o IgM, las moléculas IgE se fijan a través de su dominio constante (*véase* Sección 22.8) a la superficie de células cebadas y basófilos (Figura 22.23). Las **células cebadas**

TABLA 22.6 Alergenos frecuentes en la hipersensibilidad de tipo inmediato

Polen y esporas de hongos (fiebre del heno)
Venenos de insectos (picadura de abeja)
Algunos alimentos
Caspa (epitelio) de animales
Ácaros de polvo doméstico

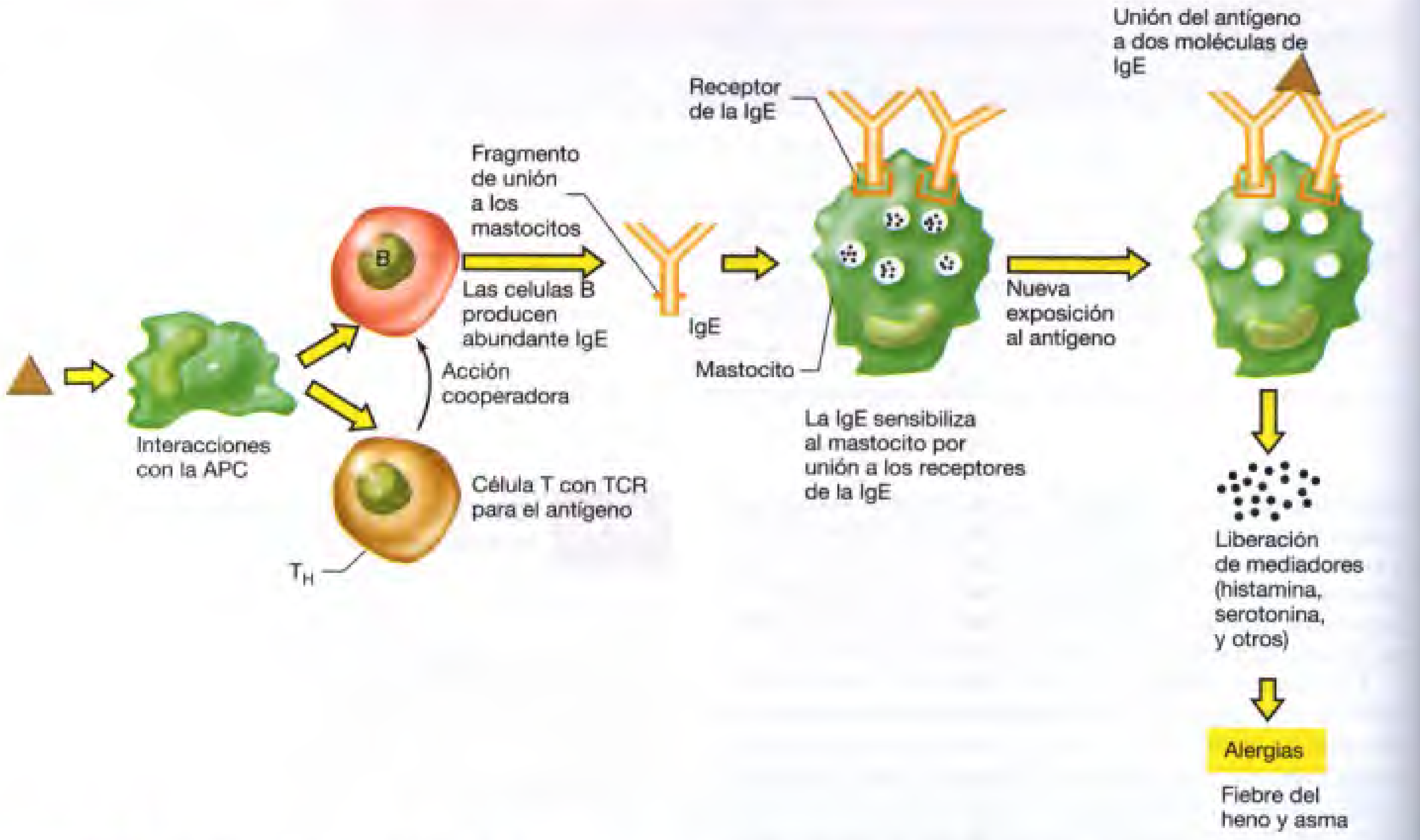

Interacciones
con la APC
B
Las celulas B
producen
abundante IgE
Acción
cooperadora
Célula T con TCR
para el antígeno
T_H
Fragmento
de unión
a los
mastocitos
IgE
Receptor
de la IgE
Mastocito
La IgE sensibiliza
al mastocito por
unión a los receptores
de la IgE
Nueva
exposición
al antígeno
Unión del antígeno
a dos moléculas de
IgE
Liberación
de mediadores
(histamina,
serotonina,
y otros)
Alergias
Fiebre del
heno y asma

Figura 22.23 Hipersensibilidad inmediata. Las IgE se unen a los mastocitos con alta afinidad por los dominios C_H4. La unión arma a los mastocitos. El nuevo contacto antigénico y el entrecruzamiento de las IgE inicia la liberación de mediadores vaso-activos, derivando en síntomas de alergias ligeras o poniendo en riesgo la vida por anafilaxis.

(mastocitos) son células fijas del tejido conectivo, adyacentes a los capilares a lo largo de todo el organismo. Tras una posterior exposición al antígeno, la IgE unida a la célula se une al antígeno. Esta unión estimula la liberación de varios mediadores alérgicos a partir de mastocitos y basófilos.

Los mediadores químicos fundamentales liberados por mastocitos y basófilos son la **histamina** y **serotonina** (ambas son aminoácidos modificados). Se han caracterizado otros mediadores anafilácticos que son péptidos pequeños. La liberación de histamina y serotonina provoca vasodilatación y contracción del músculo liso, lo que da lugar a los signos característicos de la anafilaxis. Estos signos incluyen, entre otros, dificultad respiratoria, eritema, abundante producción de moco, estornudos, y prurito y enrojecimiento oculares. En general, los síntomas suelen ser de corta duración pero tras la sensibilización al antígeno, pueden producirse sucesivas respuestas tras exposiciones repetidas al antígeno. Según el individuo, la intensidad de las reacciones anafilácticas puede variar desde síntomas leves (o ninguno) a síntomas graves que pueden llevar al individuo al **choque anafiláctico**. En el hombre, el choque anafiláctico se caracteriza por una grave dificultad respiratoria, dilatación capilar (que produce una caída importante de la tensión arterial), y eritema y prurito cutáneos. Si estos casos graves de choque anafiláctico no se tratan inmediatamente con dosis elevadas de adrenalina para contrarrestar la contracción del músculo liso y facilitar la respiración, puede producirse la muerte.

Hipersensibilidad de tipo retardado (tipo IV)

Se trata de una forma de hipersensibilidad celular que implica a una subpoblación de células T llamadas «células T de hipersensibilidad retardada» (DTH). La sintomatología aparece de unas horas a unos días después de la exposición al agente desencadenante, la máxima respuesta normalmente ocurre entre las 24 y 48 horas siguientes después de la exposición al antígeno. Las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado están dirigidas contra determinados organismos y unos pocos antígenos propios (Tabla 22.7), y un grupo de productos químicos que covalentemente se unen a la piel, creando nuevos antígenos. El último fenómeno, conocido como **dermatitis de contacto**, es responsable de muchos de los trastornos alérgicos de la piel habituales en el hombre, entre los que se incluyen la reacción frente a la hiedra venenosa, los cosméticos y ciertos medicamentos o sustancias químicas. Poco después de la exposición al agente, aparece prurito en la piel en el lugar de contacto y, en unas horas eritema e hinchazón, expresión de una respuesta inflamatoria generalizada. Como consecuencia de la acción de las células inmunes, se produce la destrucción localizada del tejido.

TABLA 22.7 Algunas enfermedades autoinmunes en el hombre

Enfermedad	Órgano o área afectado	Mecanismo
Diabetes juvenil (diabetes mellitus insulín dependiente)	Páncreas	Autoanticuerpos contra antígenos de superficie y citoplasma de las células insulares de Langerhans (II y IV)
Miastenia grave	Músculo esquelético	Autoanticuerpos contra los receptores de acetilcolina en el músculo esquelético (II)
Síndrome de Goodpasture	Riñón	Autoanticuerpos contra la membrana basal de los glomérulos renales (II)
Artritis reumatoide	Cartílago	Autoanticuerpos contra anticuerpos de IgG propios que forman complejos y se depositan en las articulaciones, produciendo inflamación y destrucción del cartílago (III)
Enfermedad de Hashimoto (hipotiroidismo)	Tiroides	Autoanticuerpos contra antígenos de superficie de tiroides (II)
Infertilidad masculina (algunos casos)	Espermatozoides	Autoanticuerpos que aglutinan los espermatozoides del hospedador (II)
Anemia perniciosa	Factor intrínseco	Autoanticuerpos que impiden la absorción de la vitamina B_{12} (III)
Lupus eritematoso sistémico	DNA, cardiolipina, nucleoproteínas, factores de la coagulación de la sangre	Respuesta masiva de autoanticuerpos contra distintos componentes celulares, que resulta en la formación de inmunocomplejos (III)
Enfermedad de Addison	Glándulas suprarrenales	Autoanticuerpos contra antígenos de células suprarrenales (II)
Encefalomielitis alérgica	Cerebro	Respuesta celular contra el tejido cerebral (IV)
Esclerosis multiple	Cerebro	Respuesta celular y por autoanticuerpos contra el sistema nervioso central (II y IV)

Un buen ejemplo de reacción de hipersensibilidad de tipo retardado es el desarrollo de inmunidad frente al agente causal de la tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 22.24). Esta respuesta inmune celular fue descubierta por vez primera por Robert Koch durante su clásico trabajo sobre tuberculosis y se ha estudiado ampliamente. Los antígenos derivados del bacilo, que se inyectan por vía subcutánea en un animal previamente inmunizado frente al mismo antígeno, desencadenan una reacción típica en la piel que se desarrolla totalmente transcurridas de 24 a 48 horas (por el contrario, las reacciones cutáneas en respuesta a los anticuerpos, vistas previamente, se desarrollan casi inmediatamente tras la inyección del antígeno). En la región de la inyección del antígeno, las citocinas liberadas y el antígeno estimulan las células T_H1, que atraen grandes cantidades de macrófagos. Los macrófagos son responsables de la ingestión y la digestión del antígeno invasor. Las reacciones características de la piel: endurecimiento, inflamación, eritema, dolor y calor. Estas son las respuestas de la reacción inflamatoria, producto de la citocinas producidas por T_H1. Esta reacción cutánea es la base del test de la tuberculina, con el que se detecta la exposición previa *M. tuberculosis*.

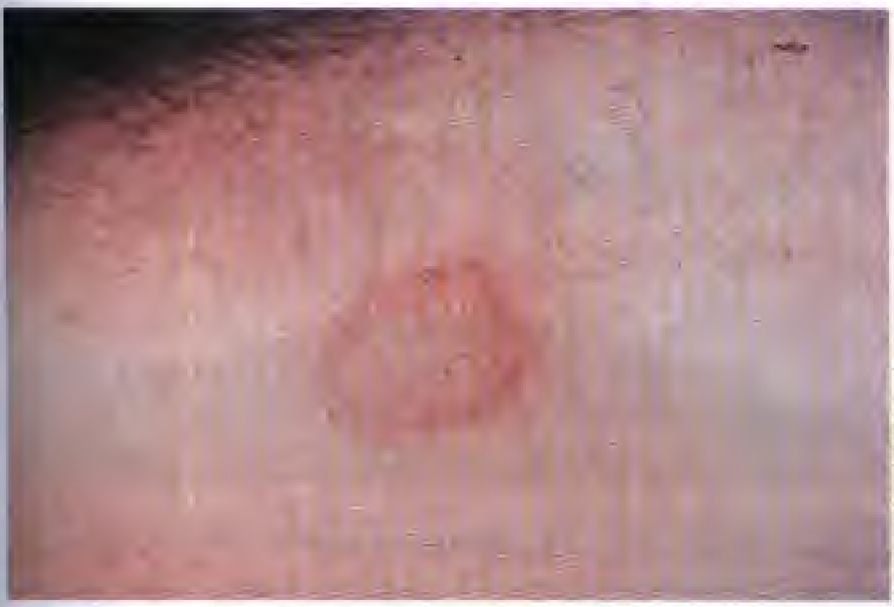

Ken Greer/Visuals Unlimited

Figura 22.24 Inmunidad mediada por células. Test positivo de tuberculina, típico de la hipersensibilidad retardada, como resultado de la acción de las T_H1. La inflamación ocupa 1,5 cm de diámetro.

Algunas infecciones microbianas desencadenan reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado. Además de tuberculosis, lepra, brucelosis, psitacosis (todas causadas por bacterias), parotiditis (causada por un virus) y coccidioidomicosis, histoplasmosis y blastomicosis (causadas por hongos). En todas estas reacciones inmunes celulares se producen reacciones cutáneas típicas después de la inyección del antígeno procedente del patógeno, que pueden usarse para el diagnóstico de una exposición previa al patógeno.

Finalmente, las células T_H1 también pueden estar implicadas en enfermedades autoinmunes, producidas frente a antígenos propios. Por ejemplo, las T_H1 están implicadas en la encefalitis alérgica de tipo I (juvenil) y en la diabetes mellitus (Tabla 22.6). Sin embargo, la mayoría de las enfermedades autoinmunes están mediadas por anticuerpos, como discutiremos a continuación.

Enfermedades autoinmunes (tipos II y III de hipersensibilidades)

Las células T y B que van a reaccionar con los autoantígenos son eliminadas durante la maduración de los linfocitos.

Sin embargo, en algunos individuos se produce la reactivación de los linfocitos T y B. La reactivación de estos clones T y B autorreactivos provoca trastornos inmunológicos que se conocen como *enfermedades autoinmunes* (Tabla 22.7).

Según el trastorno específico, la autoinmunidad puede afectar a la respuesta inmune celular o de anticuerpos dirigida contra constituyentes propios. Determinadas enfermedades autoinmunes son típicamente órgano-específicas.

Por ejemplo, en la *enfermedad de Hashimoto*, se fabrican **autoanticuerpos** contra la tiroglobulina y otros antígenos del tiroides. Las enfermedades que afectan el tiroides se clasifican como de tipo II, porque los autoanticuerpos contactan con antígenos de la superficie del tiroides y provocan la destrucción del mismo. En la *diabetes juvenil* (diabetes mellitus insulina-dependiente), se observan autoanticuerpos contra las células productoras de insulina, en los islotes de Langerhans; dichos autoanticuerpos pueden causar la enfermedad, pero la destrucción de los tejidos se produce por la vía de las células T_H1.

El *lupus eritematoso sistémico* (SLE) afecta a la producción a gran escala de autoanticuerpos frente a constituyentes propios, incluyendo el DNA. Esta enfermedad, y otras parecidas, están inducidas por complejos circulantes antígeno-anticuerpo que pueden depositarse en distintos tejidos, como el riñón y el bazo. La fijación del complemento y las subsiguientes respuestas inmunes de naturaleza lítica e inflamatoria originan un daño celular local, aunque generalmente grave en el lugar donde se depositan los complejos. El SLE es una claro ejemplo de las enfermedades de Tipo III, mediadas por inmunocomplejos.

En ocasiones, las enfermedades autoinmunes órgano-específicas son más fácilmente controladas por la clínica, pues el producto de la función del órgano, como la tirosina en el caso del hipotiroidismo o la insulina en la diabetes, con frecuencia puede suplirse en su forma pura a partir de otra fuente. Los síndromes más generalizados como el SLE pueden controlarse únicamente mediante terapia inmunosupresora, con drogas de tipo esteroide, si bien este abordaje no está exento de riesgo, por el aumento de la probabilidad de infecciones oportunistas.

Cada vez es más evidente que la herencia tiene una influencia importante en la incidencia, el tipo y la gravedad de las enfermedades autoinmunes. Se sabe que existe una tendencia hereditaria a desarrollar determinadas enfermedades autoinmunes; muchas enfermedades autoinmunes se correlacionan fuertemente con la presencia o ausencia de ciertos antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (*véanse* Secciones 22.5 y 23.2). Los estudios de modelos de enfermedades autoinmunes en el ratón apoyan dicha ligazón genética, si bien es cierto que las condiciones necesarias para el desarrollo de la autoinmunidad dependen de otros factores, que incluye los niveles hormonales y la presencia de agentes infecciosos como bacterias y virus.

✓ 22.13 Revisión de conceptos

La hipersensibilidad es la consecuencia de la acción de antígenos extraños, que estimula la inmunidad celular o humoral, y la reacción subsecuente de las células efectoras es tan intensa, que se produce un daño en el tejido del hospedador. La autoinmunidad es una respuesta inmune frente a antígenos propios, que produce un daño en el tejido del hospedador.

- ✓ Distinga entre la hipersensibilidad inmediata y la hipersensibilidad retardada, con la identificación de antígenos y efectores.
- ✓ Identifique dos categorías de enfermedades autoinmunes.

22.14 Superantígenos

En el Capítulo 21 discutimos los mecanismos de acción de diversas categorías de toxinas bacterianas. Las exotoxinas interaccionan con las células produciendo un daño (*véanse* Secciones 21.10 y 21.11). Las endotoxinas interaccionan directamente con gran cantidad de células, causando la liberación de pirógenos endógenos y otros mediadores solubles, produciendo fiebre e inflamación generalizada. Existe una familia de exotoxi-nas denominada **superantígenos**, que no actúan directamente sobre las células, pero producen una estimulación general del sistema inmune del hospedador para que produzca daño en el mismo.

Superantígenos y activación de las células T

Los superantígenos son capaces de potenciar fuertemente las respuestas inmunes porque activan más células T que otras respuestas inmunitarias. Todos estos antígenos son

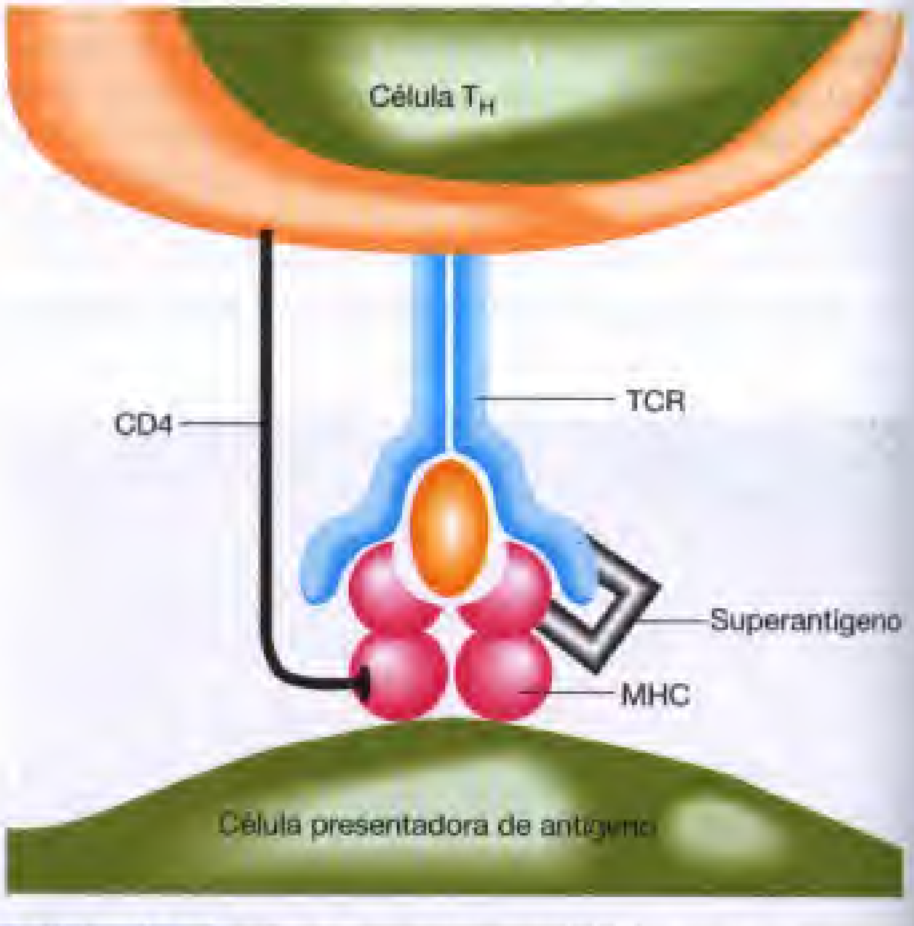


Figura 22.25 Los superantígenos bacterianos se unen a ambos MHC y TCR fuera del sitio de unión de los péptidos. Dado que los sitios de unión de los superantígenos son conservados en el MHC y el TCR, los superantígenos pueden interaccionar con gran número de células, estimulando una masiva activación de T, la liberación de citocinas e incluso la inflamación sistémica.

diferentes de los antígenos convencionales y se unen al TCR. Los superantígenos son producidos por virus y bacterias, como los estafilococos y estreptococos en gran variedad, y resultan ser muy potentes (Tabla 21.4).

Los superantígenos activan muchas células T que producen citocinas; las citocinas estimulan otras células, en particular macrófagos y otros fagocitos. Con la gran cantidad de citocinas que se producen, esta se caracteriza por la inflamación *sistémica*, generalmente causando fiebre y diarrea, vómito y producción excesiva de moco y choque sistémico. En casos extremos puede resultar fatal la exposición a superantígenos.

Los antígenos convencionales se unen a la región V del TCr, el sitio de unión al antígeno. Un antígeno normal estimula a menos del 0,01% del total de la población de células T (*véase* Sección 22.5). Los superantígenos se unen a la cadena Vβ del receptor de la célula T, *fuera* del sitio de unión al antígeno. Muchos TCR distintos comparten el sitio de unión y los superantígenos se unen a todos los que comparten esa estructura. Esta unión puede estimular entre el 5% y el 25% de las células T en el individuo afectado. Los superantígenos también se unen a las CPA y al MHC de clase II, de nuevo en un sitio fuera del de unión del péptido (Figura 22.25). Estas interacciones celulares estimulan un gran número de células T, resultando en una inflamación generalizada, como se ha mencionado antes.

Varias enfermedades se deben a superantígenos. Incluyen *Staphylococcuus aureus*, caracterizada por fiebre, vómitos y diarrea, se caracteriza por la enterotoxina estafilocócica. *Staphylococcus aureus* también produce un superantígeno, la toxina del síndrome del choque tóxico. *Streptococcus pyogenes* produce la toxina eritogénica, el superantígeno responsable de la fiebre escarlata. Otros muchos superantígenos que también producen enfermedad se mencionaron previamente (*véase* Tabla 21.4).

✓ 22.14 Revisión de conceptos

Los superantígenos se unen a gran cantidad de células T en modo nuevo, y son capaces de producir enfermedades sistémicas, caracterizadas por inflamaciones generalizadas.

- ✓ Discrimine entre antígeno normal y superantígeno, en la activación de las células T.
- ✓ Identifique el sitio de unión del superantígeno, a la célula T y a la APC.

Preguntas de repaso

1. ¿Cuál es el origen de los fagocitos y las respuestas específicas de antígeno en una respuesta inmune? Identifique dónde maduran las células B y T.
2. Explique la forma en que los macrófagos ingieren y destruyen microorganismos, haciendo hincapié en los mecanismos dependientes del oxígeno.
3. Identifique lo más importante en la respuesta de antígeno específica.
4. ¿Qué moléculas inducen respuesta inmunitaria? ¿Qué propiedades son necesarias para que una molécula induzca una respuesta inmunitaria?
5. Describa la estructura básica de las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II. ¿En qué se diferencian fundamentalmente?
6. Diferencie entre célula T_C y NK. ¿Cuál es la señal de activación para cada tipo celular?
7. ¿Cómo se diferencian las T_H y las T_C? ¿Cuál es la señal de activación para cada tipo?
8. Describa la estructura básica y las diferencias funcionales entre las cinco clases de anticuerpos.
9. Identifique las interacciones que tienen lugar para que las células B produzcan anticuerpos.
10. Describa la cascada del complemento. ¿Es el orden de las proteínas importante?, ¿por qué si o por qué no?
11. Describa las enfermedades para las qué ha sido inmunizado. Describa las enfermedades para las que tiene inmunidad natural adquirida.
12. Describa al menos una técnica biotecnológica utilizada para la inmunización. ¿Cómo esta técnica se diferencia de las estrategias convencionales?
13. Defina las diferencia entre hipersensibilidad inmediata y retardada, en términos de los efectores inmunitarios, los tejidos diana, los antígenos y el resultado clínico.
14. Describa el mecanismo general de cómo los superantígenos activan las células T. ¿Cómo se diferencian los superantígenos de los antígenos convencionales?

Ejercicios prácticos

1. Describa los problemas potenciales de un individuo incapaz de fagocitar patógenos. ¿Podría el individuo sobrevivir? Explíquelo.
2. La tolerancia específica es necesaria para la calidad de la respuesta adaptativa; sin embargo, la memoria resulta menos imprescindible, por lo menos al primer vistazo.
3. Trace la trayectoria de un patógeno que entra en el cuerpo a través de una herida, por la pantorrilla izquierda. ¿Qué células reconocen primero el patógeno? ¿En qué lugar se iniciará la infección? ¿Qué células y órganos estarán implicados en la destrucción del patógeno? ¿Qué células y órganos estarán implicados en

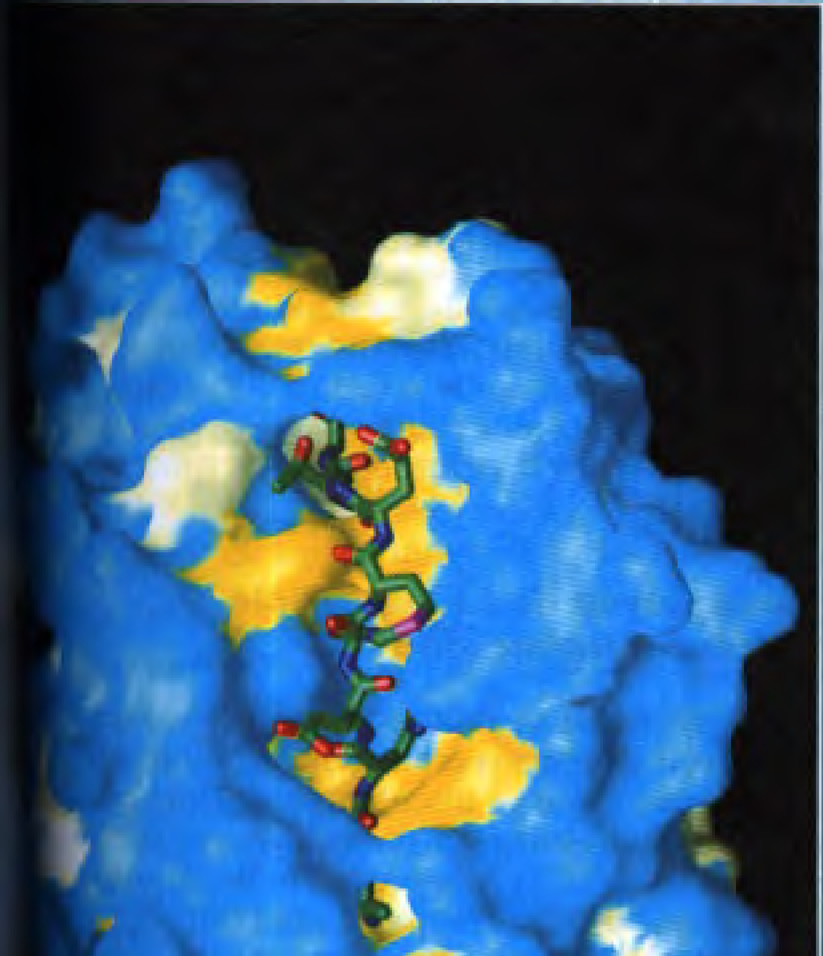
la producción de inmunidad específica frente al patógeno?

4. Todos los inmunógenos son antígenos, sin embargo, no todos los antígenos son inmunógenos. Explique estos razonamientos utilizando ejemplos moleculares.
5. Describa el potencial problema de un individuo que no sea capaz de presentar antígeno a las T_C, ¿y a las T_H?, ¿y a las T_H y las T_C? ¿Qué moléculas son deficientes en cada individuo? ¿Cuál de los dos individuos podría sobrevivir en un ambiente normal? Explíquelo.
6. Diferencie entre la protección de las T_C y las NK. ¿Es alguna de estas células más importante para la supervivencia? Explíquelo.
7. En determinadas situaciones, las células B son activadas en ausencia de células T. ¿Qué podría impedir a las células T «ayudar» a las células B? *Sugerencia:* piense en el procesamiento de los antígenos; ¿son los polisacáridos procesados de igual manera que las proteínas?
8. Los anticuerpos de tipo IgA son más prevalentes que los de tipo IgG. Explique por qué se produce esta situación y qué ventajas confieren los tipo IgA para el hospedador.
9. ¿Cómo la interacción del TCR se diferencia de las inmunoglobulinas (Ig)? ¿Qué diferencias fundamentales se encuentran entre el reconocimiento de T y de B?
10. El complemento es contemplado como un mecanismo esencial de la defensa humoral. ¿Está de acuerdo? Explíquelo. ¿Qué puede pasar con los individuos que carezcan de C3?, ¿y de C5?
11. ¿Es protectiva la administración de un anticuerpo para el antígeno de superficie del virus de la gripe para no sufrir la enfermedad? ¿Puede proteger a los individuos frente a una epidemia de gripe? ¿Es posible que los anticuerpos protejan durante un largo periodo?, ¿por qué sí o por qué no?
12. Muchas enfermedades infecciosas no tienen vacunas efectivas. Escoja alguna de estas enfermedades (por ejemplo, SIDA, malaria o resfriado común) y explique cómo las vacunas no han sido efectivas. Prepare una estrategia efectiva para las vacunas que ha escogido.
13. Las enfermedades autoinmunes son muy frecuentes a partir de los 50 años. ¿Qué enfermedades son más frecuentes entre entre los ancianos y por qué pasa esto?
14. Para un patógeno ¿es una ventaja evolutiva producir un superantígeno? Dé un ejemplo que soporte su teoría. ¿Cómo podría un hospedador evitar el problema que supone la activación masiva de células T producida por los superantígenos? De nuevo piense en términos evolucionistas.

La respuesta inmunitaria opera mediante una serie de interacciones moleculares de la superficie de la célula. Un paso crítico en el reconocimiento del patógeno es la presentación de proteínas procedentes del patógeno en el contexto de una proteína del hospedador, conocida como el complejo principal de histocompatibilidad, que se muestra aquí. La proteína del patógeno, ahora incrustada en la proteína del hospedador, es reconocida por linfocitos del patógeno específico. El reconocimiento induce linfocitos a la proteína del patógeno incrustada y responde destruyendo cualquier célula que presente esa proteína; de esta manera, los linfocitos eliminan el patógeno del hospedador.

23

INMUNOLOGÍA MOLECULAR



I LOS GENES DE LA SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS 780

23.1 Receptores de la superficie celular e inmunidad 780

II EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) 781

23.2 Estructura de las proteínas del MHC 782

23.3 Polimorfismo y genes del MHC 783

III ANTICUERPOS 784

23.4 Anticuertos y unión al antígeno 784

23.5 Los genes de los anticuerpos y la diversidad 785

IV LOS RECEPTORES DE LAS CÉLULAS T 787

23.6 Las proteínas del TCR y la unión al antígeno 787

23.7 Genes del TCR y diversidad 788

V SEÑALES MOLECULARES E INMUNIDAD 789

23.8 Selección clonal y tolerancia 789

23.9 Señales secundarias 791

23.10 Citoquinas y quimioquinas 792

Glosario

Agretopo porción del antígeno procesado reconocido por el MHC

Anergia incapacidad de producir una respuesta frente a antígenos específicos debido a la neutralización de las células efectoras

Anticuerpo proteína soluble, producida por los linfocitos B, que interacciona con el antígeno; también se le conoce como inmunoglobulina

Apoptosis programmed cell death

Citoquina proteína pequeña, soluble, producida por un linfocito y encargada de modular las reacciones inflamatorias y la inmunidad a través de sus efectos en las células diana

Complejo Principal de histocompatibilidad (MHC) región génica que codifica diferentes proteínas de superficie relacionadas con el procesamiento y presentación de antígenos

Delección clonal eliminación, en el timo, de los linfocitos T autorreactivos y los no reactivos

Dominio región de una proteína con una determinada función o estructura

Epitopo porción de un antígeno que es reconocida por una inmunoglobulina o un receptor de célula T

Genes de la superfamilia de las inmunoglobulinas familia de genes que están, evolutiva, estructural y funcionalmente relacionados con las inmunoglobulinas

HLA antígenos leucocitarios humanos

Inmunoglobulina (Ig) proteína soluble, producida por los linfocitos B que interacciona con el antígeno; también se le conoce como anticuerpo

MHC de clase I proteína presentadora de antígenos presente en todas las células nucleadas de vertebrados

MHC de clase II proteína presentadora de antígenos presente en macrófagos, linfocitos B y células dendríticas (células presentadoras de antígeno)

Motivo secuencia conservada de aminoácidos que se encuentra en todos los péptidos antigénicos que se unen a una determinada proteína del MHC

Polimorfismo la existencia de múltiples alelos en un *locus* con una frecuencia que no puede explicarse por la presencia de mutaciones al azar recientes

Quimioquina proteína pequeña, soluble, producida por diferentes células y encargada de modular las reacciones inflamatorias y la inmunidad a través de sus efectos en las células diana

Receptor de célula T (TCR) receptor proteico de la superficie de los linfocitos T que reconoce específicamente al antígeno

Regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) variaciones en la secuencia de aminoácidos que tienen lugar en las regiones variables de las Igs o los TCRs en las que ocurren la mayoría de los contactos moleculares con el antígeno (también conocidas como regiones hipervariables)

Regiones hipervariables variaciones en la secuencia de aminoácidos que tienen lugar en las regiones variables de las Igs o los TCRs en las que ocurren la mayoría de los contactos moleculares con el antígeno (también conocidas como regiones determinantes de la complementariedad)

Selección clonal los linfocitos T y B producen copias de sí mismos cuando son estimulados por un antígeno

Selección negativa en la maduración de los linfocitos T, los que reconocen antígenos propios en el timo son eliminados (*véase* delección clonal)

Selección positiva en la maduración de los linfocitos T, los que en el timo interaccionan con el MHC propio estimulan su crecimiento y desarrollo

Tolerancia ausencia de respuesta inmune frente a un antígeno determinado

En el capítulo anterior se presentaron las características y funciones principales de la respuesta inmunitaria. En el presente capítulo, nos basaremos en esos principios para discutir sobre las proteínas y las interacciones moleculares que subyacen a la respuesta inmunitaria. Primeramente examinaremos en detalle las proteínas que interaccionan con los antígenos: las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), Los receptores de los linfocitos T (TCR) y las inmunoblogulinas (Igs). También abordaremos las bases genéticas de la generación de diversidad de todas las moléculas anteriores. En la parte final, nos centraremos en las interacciones intercelulares que activan y controlan la respuesta inmunitaria.

I LOS GENES DE LA SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Los **genes de la superfamilia de las inmunoglobulinas** son un grupo de genes que codifican proteínas que comparten elementos estructurales, evolutivos y/o funcionales con los genes y proteínas de las inmunoglobulinas. Estudiamos esta superfamilia aquí dado que las distintas proteínas, relacionadas con el sistema inmunitario, que se unen a los antígenos pertenecen a esta superfamilia.

23.1 Receptores de la superficie celular e inmunidad

Existen tres tipos diferentes de proteínas de superficie que interaccionan específicamente con antígenos durante una respuesta inmunitaria, como ya discutimos en el Capítulo 22. Son: las **inmunoglobulinas** (Igs o anticuerpos), los receptores de las células T (TCR) y los productos de los genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), las **proteínas MHC**. Aunque todas estas proteínas son capaces de unirse a antígenos, presentan una diferente localización, estructura y función. Las proteínas MHC se encuentran en las células presentadoras de antígeno y en las células diana que presentan antígenos a TCR's, los cuales se encuentran exclusivamente en linfocitos T (Sección 22.5). inmunoglobulinas, que se encuentran en los linfocitos B, interaccionan directamente con antígenos extracelulares (Sección 22.8).

Estructura y evolución de las proteínas que unen antígeno

Las inmunoglobulinas, receptores de células T y las proteínas MHC comparten elementos estructurales que están claramente relacionados desde un punto de vista evolutivo. Su análisis molecular y estructural indica que todas ellas pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y que han evolucionado mediante duplicación y posterior selección. Los elementos básicos de las proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas aparecen en la Figura 23.1. Cada proteína presenta, al menos, una región muy conservada, llamada **dominio constante** (C) de alrededor de 100 aminoácidos conteniendo un enlace disulfuro intercatenario que abarca unos 50-70 residuos. Beta-2 microglobulina (β2m), parte de las proteínas de MHC tipo I (*véase* Sección 23.2), realmente consiste en un dominio C simple. El dominio variable (V) del TCR, IG y proteínas del MHC son de un tamaño similar al de las regiones constantes, pero los dominios V son considerablemente diferentes entre sí y de los dominios C. Los dominios C proporcionan integridad estructural a estas proteínas y son las encargadas de unir las regiones V a la membrana y determinan su forma característica. Los dominios C también actúan como dianas para la interacción con otras moléculas accesorias. Por ejemplo, el dominio constante de las IgG e IgM unen a proteínas del sistema del complemento (Sección 22.10); los dominios constantes de las moléculas de MHC de tipo I son capaces de unirse a la molécula accesoria CD8 en los linfocitos T citotóxicos y, del mismo modo, las moléculas de MHC de tipo II son capaces de unirse a CD4 en los linfocitos T colaboradores (Sección 22.5). Sin embargo, los dominios V han evolucionado para interaccionar con una amplia variedad de antígenos.

TCR, Ig y las proteínas del MHC están formadas por dos polipéptidos distintos que se asocian para dar lugar a la proteína funcional, y todos ellos son expresados en la superficie de las células como receptores de antígenos. No obstante, como discutimos en al Capítulo 22, la función de cada una de estas proteínas es bastante diferente. Las Igs ancladas a la superficie de los linfocitos B, se unen a proteínas de bacterias, virus y productos bacterianos tales como toxinas; las Igs estan también en gran cantidad de forma soluble. Los TCRs se encuentran exclusivamente en los linfocitos T, interaccionan con péptidos antigénicos presentados por células diana o por células presentadoras de antígeno (APCs). Las proteínas del MHC llevan los péptidos antigénicos a la superficie de las células diana o de las APCs. Las células T reactivas frente a un antígeno eliminan la célula diana con la que interaccionan o producen proteínas que van a disparar la respuesta inmunitaria (Sección 22.6 y Sección 22.7).

✓ 23.1 Revisión de conceptos

La superfamilia de los genes de las inmunoglobulinas está compuesta por genes que evolutiva, funcional y estructuralmente están relacionados con las inmunoglobulinas. Entre los miembros de esta superfamilia encontramos: las inmunoglobulinas de superficie de los linfocitos B, los receptores de las células T, las proteínas del MHC de tipo I y II, y otras proteínas involucradas en la respuesta inmunitaria.

- ✓ ¿Describa las características estructurales del dominio C de las inmunoglobulinas?
- ✓ ¿Por qué la estructura de los dominios V es diferente de la de los C?

II EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) está formado por un grupo de genes presentes en todos los vertebrados. El MHC ocupa alrededor de 4 millones de pares

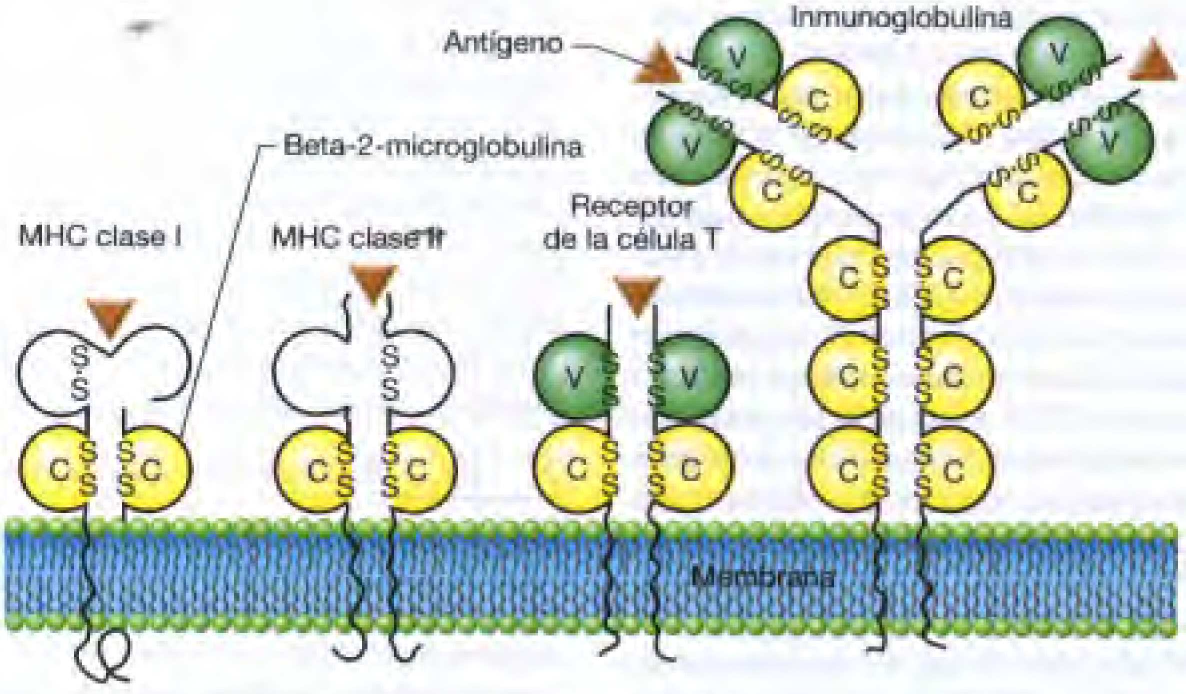


Figura 23.1 Los dominios constantes (C) de las proteínas codificadas por los genes de la superfamilia de las inmunoglobulinas son secuencias de aminoácidos muy conservadas, incluso en su estructura tridimensional. La presencia de dominios C similares a los de las Igs identifica a una proteína como miembro de esta familia e indica una fuerte relación evolutiva. Sin embargo, las regiones variables (V) de las Igs, TCRs y los dominios de interacción con el antígeno de las proteínas del MHC de tipo I y II no pueden ser catalogados como miembros de la superfamilia de las Igs debido a su variabilidad y diferente estructura. Presumiblemente todos estos dominios evolucionaron a partir de dominios Ig, pero la selección evolutiva que les llevó a unir determinados antígenos hizo que perdieran cualquier homología estructural con los dominios C de las Ig.

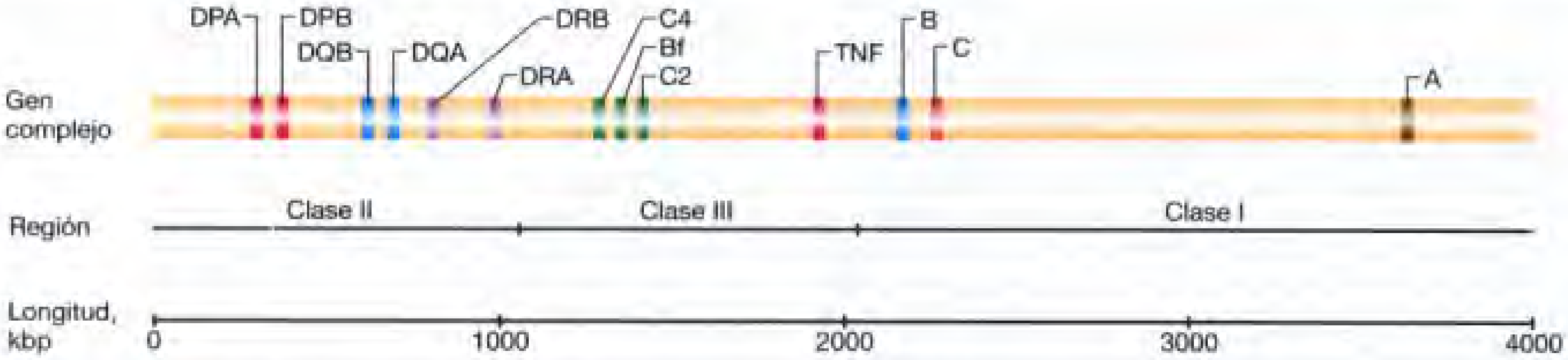


Figura 23.2 Mapa del MHC humano. El MHC humano se conoce como complejo HLA (complejo de antígenos leucocitarios humanos). El complejo HLA está localizado en el cromosoma VI y ocupa entorno a 4 millones de pares de bases. Los genes del HLA de tipo II DPA y DPB codifican las proteínas DPα y DPβ; los genes DQA y DQB codifican DQα y DQβ; los genes DRA y DRB codifican DRα y DRβ; los genes de clase III codifican diversas, unas proteínas relacionadas con funciones inmunitarias y otras con funciones diferentes a las inmunitarias. C4 y C2 codifican las proteínas del sistema del Complemento C4 y C2 (Sección 22.10). El gen TNF codifica una citoquina, el factor de necrosis tumoral (*véase* Sección 23.10). Las proteínas del MHC de tipo I HLA-B, HLA-C y HLA-A están codificadas en la región de clase I por los genes B, C y A. Más de 200 genes, muchos de ellos involucrados en el reconocimiento o procesamiento de antígenos, están localizados en el complejo HLA.

de bases del cromosoma VI humano. El MHC humano se conoce como HLA (antígenos leucocitarios humanos) (Figura 23.2). Los productos del MHC incluyen diferentes proteínas implicadas en el procesamiento y presentación de le antígenos. En esta sección vamos a examinar las características genéticas y estructurales de dos proteínas del MHC que unen tanto antígenos como TCR.

23.2 Estructura de las proteínas del MHC

Las proteínas del MHC fueron descubiertas debido a su implicación en el rechazo de transplantes. A pesar de que la función biológica real de las proteínas del MHC es unir y presentar antígenos a las células T (Sección 22.5).

Las proteínas del MHC se pueden dividir en dos clases de acuerdo a su estructura. Las de clase I se encuentran en la superficie de todas las células nucleadas y están encargadas de presentar antígeno a los linfocitos T citotóxicos (T_C). Si los péptidos presentados por las proteínas de clase I son reconocidos como extraños, la célula que presenta ese antígeno es directamente eliminada por el linfocito T_C (Sección 22.6). Las proteínas de clase II del MHC se encuentran únicamente en la superficie de los linfocitos B, macrófagos y células dendríticas, todas ellas con función presentadora de antígenos (APCs) (Sección 22.5). Mediante las proteínas de clase II las APCs presentan los antígenos a los linfocitos T colaboradores, estimulando las reacciones inflamatorias o de producción de anticuerpos (Sección 22.7).

Proteínas del MHC de clase I

Las **proteínas del MHC de clase I** están compuestas de dos polipéptidos (Figuras 23.1 y 23.2). Una cadena α transmembranal, con un peso molecular de 42 000 y codificada por un gen que se encuentra en la región del MHC del cromosoma VI. El otro polipéptido de clase I se conoce con el nombre de β-2 microglobulina (β_2m) con un peso molecular de 12 000 y se asocia de forma no covalente al anterior.

La estructura tridimensional de las proteínas del MHC de tipo I revela una forma que sugiere cómo puede interaccionar esta proteína, tanto con el antígeno como con el TCR, simultáneamente (Figura 23.3). La cadena α se pliega para formar una gran hendidura entre los dominios α1 y α2, y es en esta hendidura donde la molécula de MHC une los péptidos antigénicos. La hendidura está cerrada por ambos extremos lo que limita el tamaño del péptido unido a 8-10 aminoácidos. La superficie de las proteínas del MHC de clase I se compone de dos α-hélices que junto con el péptido unido, forman una superficie de contacto con la que interacciona específicamente con el TCR, como discutiremos más tarde (*véase* Sección 23.6).

Proteínas del MHC de clase II

Las **proteínas del MHC de clase II** están formadas por polipéptidos transmembrana, unidos de forma no covalente llamados α y β, con un peso molecular 33 000 y 28 000 respectivamente (Figura 23.1 y Figura 23.3). Las proteínas de clase II suelen formar un dímero, lo que incrementa su capacidad de unirse al TCR. Los dominios α1 yβ1 de estas proteínas interaccionan formando el sitio de unión del péptido, sitio que es muy similar al presentado por las proteínas de tipo I. En el caso de las proteínas de tipo II, la hendidura está *abierta* lo que permite a las proteínas de clase II unir péptidos de un tamaño significativamente mayor a los 10 residuos de los péptidos presentados por las proteínas de clase I (Figura 23.3).

✓ 23.2 Revisión de conceptos

Las proteínas del MHC de clase I son expresadas por todas las células. Su función es presentar los péptidos antigénicos del citosol a los receptores de las células T citotóxicas. Las proteínas del MHC de clase II se expresan exclusivamente en las células presentadoras de antígeno. Su función consiste en presentar antígenos peptídicos externos a los receptores de las células T colaboradoras.

- ✓ Compare las estructuras de las proteínas del MHC de clase I y II. ¿En qué se diferencian? ¿En qué se parecen?
- ✓ Compare los sitios de unión al péptido de las proteínas del MHC de clase I y II. ¿En qué se diferencian? ¿En qué se parecen?

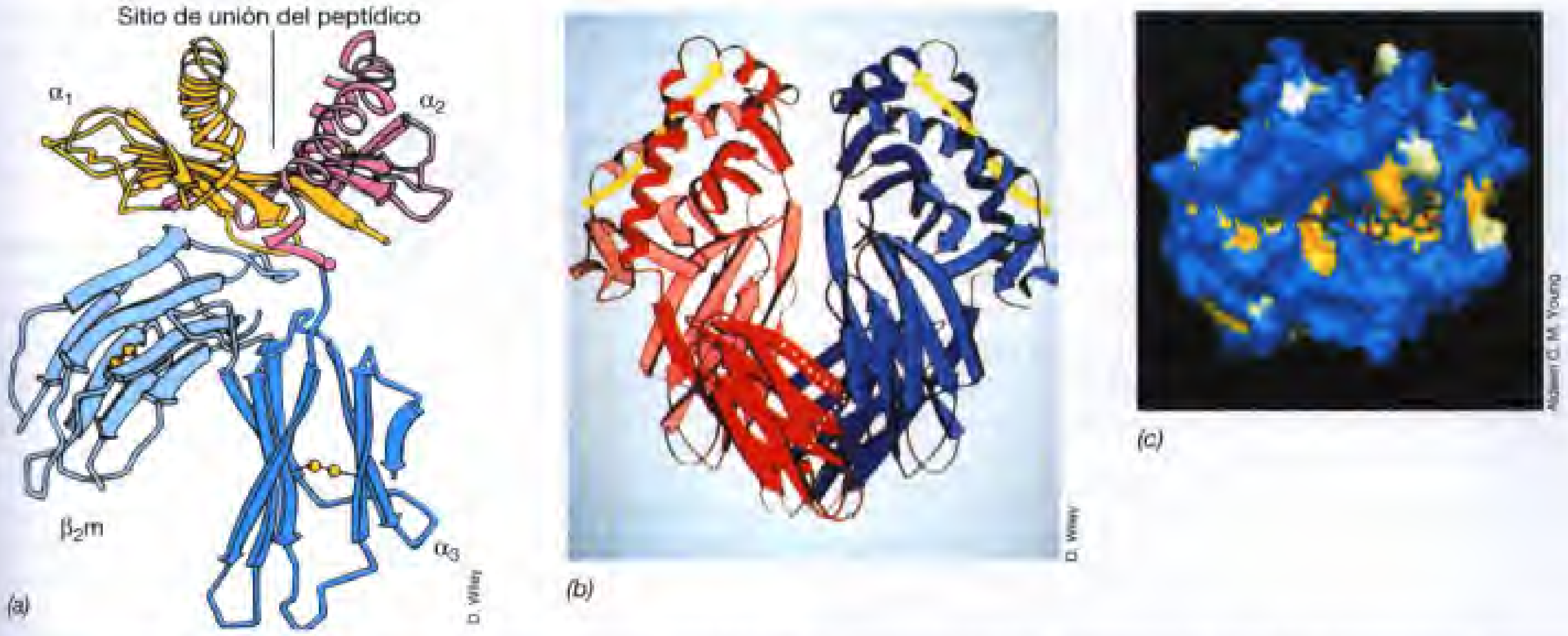


Figura 23.3 Estructuras tridimensionales de las proteínas del MHC. (a) Proteína de clase I. (b) Proteína de clase II en forma de dímero. Las flechas amarillas indican los sitios de unión del péptido. Reproducción con el permiso de *Nature* 364:33 (1993), © Mcmillan Magazines. (c) Modelo espacial de una proteína de clase I con un péptido unido, como se vio anteriormente. Puede verse un péptido de 9 residuos en verde claro, rodeado por la proteína humana de clase I (azul). (d) Modelo espacial de una proteína de clase II con un péptido unido, como se vio anteriormente. En rojo se muestra un péptido de 17 residuos proveniente de la ovoalbumina, rodeado por una proteína de clase II del ratón (azul). Los modelos de las proteínas de clase I y II fueron tomados de la base de datos *Protein Data Bank*.

23.3 Polimorfismo y genes del MHC

Existen, al menos, tres *loci* para los genes del MHC de tipo I, HLA-A, -B y -C, mostrando, todos ellos, un elevado nivel de polimorfismo. El **polimorfismo** se puede definir como la existencia de múltiples alelos en un *locus*, con una frecuencia que no puede ser explicada por el acontecimientos de mutaciones al azar recientes. Por ejemplo, hay 95, 207 y 50 alelos distintos en los loci HLA-A, -B y -C, respectivamente. En consecuencia, dentro de la especie humana, existen múltiples polimorfismos en cada *locus*. Sin embargo, cada individuo solamente dispone de dos de esos alelos en cada *locus* (uno de ellos proviene de la herencia paterna y el otro de la materna). Las dos variantes alélicas son expresadas de forma *codominante* (los dos y con la misma intensidad). Del mismo modo, los *loci* que codifican las proteínas del HLA de clase II, HLA-DR, DP y DQ, son altamente polimórficos. Los genes de clase II, de nuevo, son expresados de forma codominante. Así pues, un individuo, normalmente, dispone de seis proteínas de clase I genética y estructuralmente distintas, así como de seis proteínas diferentes de clase II. Las variaciones polimórficas de las proteínas del MHC son el mayor obstáculo para el éxito en el transplante de tejidos, ya que, las proteínas del MHC del tejido donante (injerto) son reconocidas como antígenos extraños por el sistema inmunitario del individuo receptor. La respuesta inmunitaria dirigida contra las proteínas del MHC del injerto produce la muerte de las células que lo conforman y su rechazo.

La organización genética y la expresión de las moléculas del MHC es muy sencilla: un gen codifica una proteína. Sin embargo, la naturaleza polimórfica de los genes del MHC asegura que, dentro de una población humana, haya un amplio y variado conjunto de proteínas del MHC disponibles para la presentación de antígenos. El polimorfismo genético implica que cada alelo del MCH codifica una proteína con diferente secuencia de aminoácidos. Dichas diferencias están concentradas en la hendidura de unión al péptido (Figura 23.3) y determinan que cada variante polimórfica del MHC se una a un conjunto diferente de antígenos peptídicos. Los péptidos unidos por una determinada proteína del MHC comparten patrones, o motivos, estructurales comunes, de modo que cada proteína del MHC se une a un determinado patrón o motivo. Por ejemplo, todos los péptidos de 10 aminoácidos que se unen a una determinada proteína de clase I tienen una tirosina en posición 2 y una leucina en posición 7. Así, todos los péptidos con la secuencia **X-Tirosina-X-X-X-X-leucina-X-X-X** (X representa cualquier aminoácido) podrían ser unidos y presentados por esta proteína concreta del MHC. Otra proteína del MHC de clase I codificada por otro alelo polimórfico podría, preferentemente, unirse a un motivo diferente, con una valina en posición 4 y una prolina en posición 8 **(X-X-X-valina-X-X-X-prolina-X-X)**. Los aminoácidos constantes de cada motivo se conocen como *residuos de anclaje*, ya que se unen directa y específicamente a la hendidura de una proteína concreta del MHC. Consecuentemente, una determinada proteína del MHC puede unir y presentar un gran número de péptidos diferentes, siempre que dispongan de los residuos de anclaje apropiados; cada proteína diferente del MHC une y presenta péptidos con diferentes motivos y, por tanto, diferentes residuos de anclaje. De esta manera, un número limitado de proteínas del MHC es capaz de unir y presentar una cantidad muy elevada de péptidos antigénicos diferentes. Por el contrario, las otras proteínas capaces de unirse al antígeno, Igs y TCRs, deben interaccionar muy específicamente con un número, prácticamente infinito, de antígenos y, por tanto, han de valerse de un mecanismo genético diferente para generar una diversidad en la especificidad del receptor mayor, incluso, a la manifestada por las proteínas del MHC.

✓ 23.3 Revisión de conceptos

El MHC está formado por un grupo de genes que codifican proteínas involucradas en el procesamiento y presentación de antígenos. Los genes del MHC de clase I y II son los genes más polimórficos que se conocen. Los alelos del MHC de clase I y II codifican proteínas capaces de unirse a péptidos con motivos estructurales conservados específicos.

- ✓ Defina y explique el polimorfismo en los genes del MHC.
- ✓ ¿Cómo facilita el polimorfismo de las proteínas del MHC la presentación de un gran número de antígenos a los receptores de las células T?

III ANTICUERPOS

Los **anticuerpos** o **inmunoglobulinas (Ig)** se pueden encontrar como receptores de superficie de los linfocitos B, o en forma soluble a altas concentraciones en el suero sanguíneo y otros fluidos corporales, donde se encargan de neutralizar y opsonizar antígenos extraños (Sección 22.10). En la presente sección, vamos a analizar la estructura, la unión con el antígeno y la organización genética de la infinita variedad de anticuerpos.

23.4 Anticuertos y unión al antígeno

Como discutimos previamente (*véanse* Sección 23.1 y Capítulo 22), las inmunoglobulinas constan de cuatro polipéptidos, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. La unidad funcional capaz de unir a un antígeno está determinada por el heterodímero formado por una cadena pesada y una ligera. Además, tanto la cadena ligera como la pesada, están divididas en un dominio constante (C) y otro variable (V). El dominio C es el encargado de las funciones comunes de todos los anticuerpos, como son la unión del complemento; mientras que el dominio V de la cadena ligera y la pesada interaccionan entre sí para formar el sitio de unión al antígeno (Figura 23.4). En este apartado vamos a analizar las características estructurales de los dominios V así como del sitio de unión del antígeno.

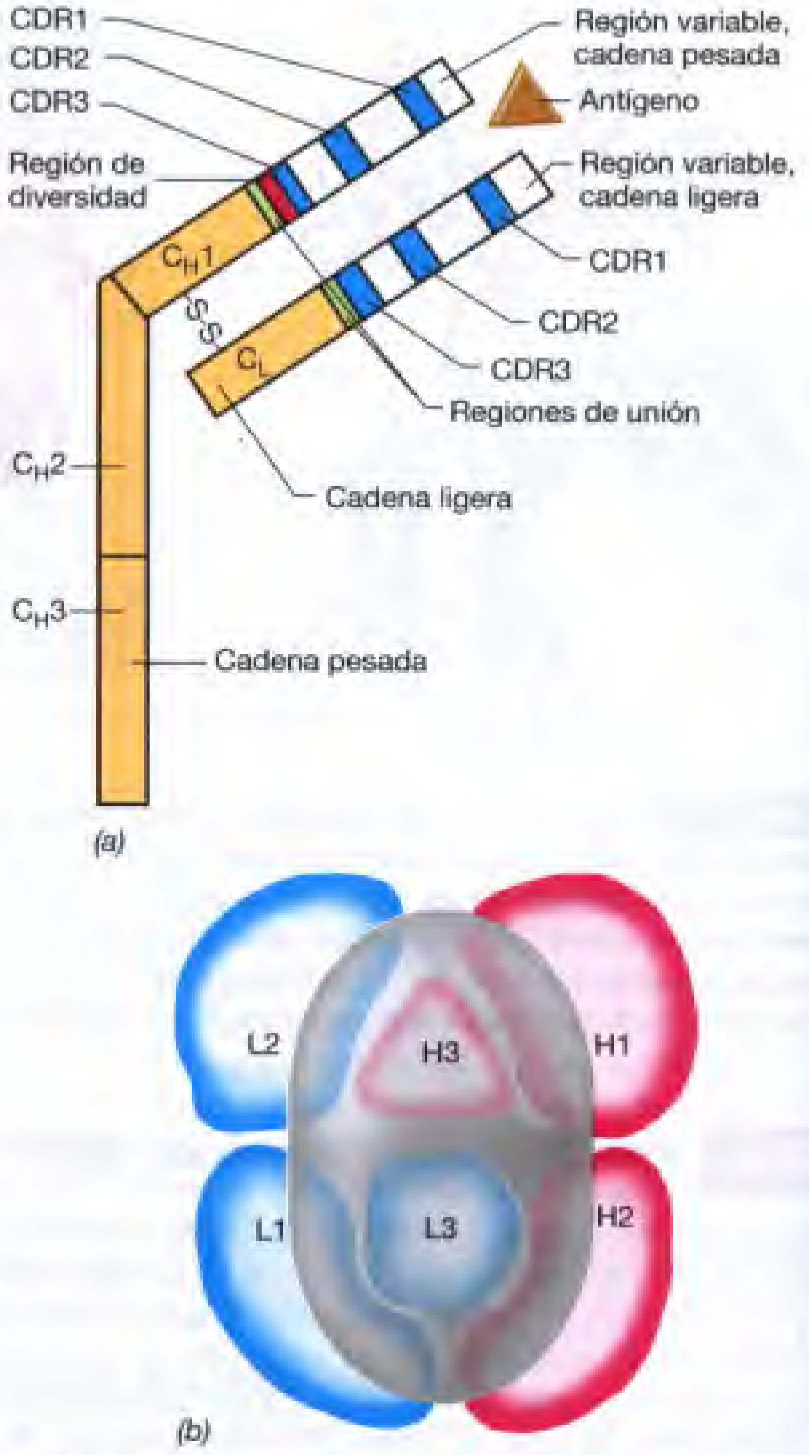


Figura 23.4 Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de una inmunoglobulina. (a) Representación esquemática de la mitad de una inmunoglobulina típica. C_H y C_L representan los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera, respectivamente. (b) Las regiones determinantes de la complementariedad, tanto de la cadena ligera como de la pesada, en (a) determinan la formación de un solo sitio de unión al antígeno en la inmunoglobulina. Las zonas de unión rojas pertenecen a la cadena pesada, las zonas de unión azules son de las cadenas ligeras. Las zonas de unión están numeradas indicando el CDR y la cadena. Por ejemplo, L1 sería CDR1 de la cadena ligera. Las zonas de alta variabilidad CDR3s, tanto de la cadena pesada como de la ligera, cooperan en el centro del sitio de unión. Un antígeno está representado en gris, cubriendo el sitio de unión y contactando con todos los CDRs. La forma actual del sitio de unión podría ser como una hendidura superficial o como un bolsillo profundo, dependiendo del par antígeno-anticuerpo elegido.

Dominios variables

En los *dominios variables* (V) de las distintas Igs existen diferencias en la secuencia de aminoácidos (Figura 23.4). Esta variabilidad es especialmente marcada en diferentes zonas llamadas **regiones hipervariables**. Estas zonas hipervariables, también llamadas **regiones determinantes de la complemetariedad (CDR)**, determinan la mayoría de los contactos moleculares con el antígeno. Cada dominio V, tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada, dispone de tres CDRs. Los dominios CDR1 y CDR2 son ligeramente diferentes entre las distintas inmunoglobulinas; por el contrario, los dominios CDR3 presentan enormes diferencias entre ellos. El dominio CDR3 de la cadena pesada tiene una estructura particularmente compleja. Estudios de la secuencia de aminoácidos de CDR3 indican que están formados por la porción carboxi-terminal del dominio V seguido por un segmento de escasa diversidad (D) de alrededor de 3 aminoácidos, y una región de unión (J) de entre 13 y 15 residuos. La cadena ligera presenta una organización similar en su dominio CDR3, pero carece de la región D. Todos los CDRs están involucrados en la unión al antígeno.

Unión al antígeno

La estructura tridimensional de una inmunoglobulina se muestra en la Figura 22.15. El principio de todas las reacciones de los anticuerpos se basa en la *específica* combinación de determinantes del antígeno con la región *variable*. El sitio de unión del antígeno de un anticuerpo está formado por la asociación de una cadena ligera y una cadena pesada, mide entorno a 2 × 3 nm, y es capaz de unir un epítopo de un tamaño aproximado de entre 10-15 aminoácidos. El reconocimiento de un antígeno está determinado por el plegamiento de las cadenas pesada y ligera de la Ig. Este plegamiento en las regiones V posibilita la existencia de seis CDRs (CDR1, 2 y 3 tanto de la cadena ligera como de la pesada) en la zona teminal de la inmunoglobulina. El resultado es un *único* y *específico* sitio de unión del antígeno (Figura 22.15 y Figura 23.4*b*). En la siguiente sección, vamos a centrarnos en los mecanismos que determinan la existencia de tan tremenda diversidad en las inmunoglobulinas.

✓ 23.4 Revisión de conceptos

El sitio de unión del antígeno de una inmunoglobulina se compone de los dominios variables (V) tanto de la cadena ligera como de la pesada. Cada cadena pesada y ligera contiene tres regiones determinantes de la complementariedad, o CDRs, que se pliegan para formar el sitio de unión del antígeno.

- ✓ Describa las contribuciones de las regiones V, D y J de la cadena pesada y de las regiones V y J de la cadena ligera a los CDRs.
- ✓ Dibuje una inmunoglobulina completa y localice los sitios de unión entre el anticuerpo y el antígeno.

23.5 Los genes de los anticuerpos y la diversidad

Hemos visto cómo el polimorfismo genético en el MHC permite que las proteínas del MHC sean capaces de unir un elevado número de antígenos diferentes (*véase* Sección 23.3). En el MHC, un gen codifica una proteína que une determinados péptidos antigénicos. Siguiendo esta argumentación, si un linfocito B produce una Ig, un gen debería codificar la cadena ligera y otro la pesada. Sin embargo, éste no es el caso, ya que los anticuerpos han de reconocer y unir específicamente una variedad casi infinita de estructuras moleculares a partir de un número limitado de genes, por tanto, debe emplearse otra estrategia generadora de diversidad.

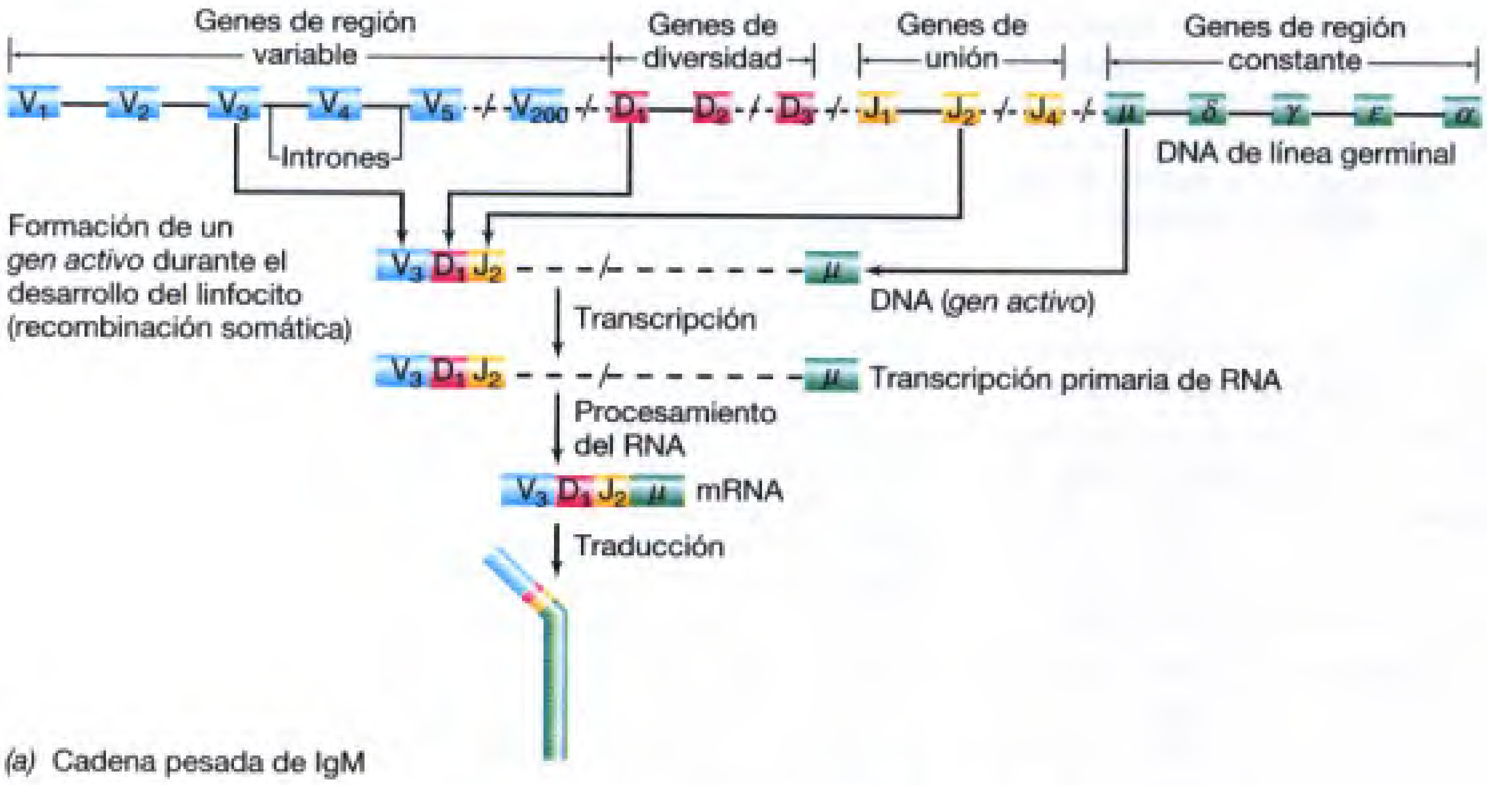
Genes en fragmentos

Durante el desarrollo de los linfocitos B, una única cadena ligera o pesada es codificada por *diferentes* genes los cuales determinan una compleja serie de reagrupamientos (recombinación seguida por delección de las secuencias involucradas). Esta estrategia de reagrupamientos génicos es mucho más eficiente para las Igs (y los TCRs) que la estrategia «un gen una proteína» seguida por las proteínas del MHC y la mayoría de las proteínas. Los reagrupamientos génicos permiten la formación de una variedad de anticuerpos prácticamente ilimitada a partir de apenas 400 genes diferentes. Estudios moleculares apoyan la hipótesis de «genes en fragmentos» demostrando que los genes que codifican las regiones V, D, J y C se encuentran separados en el genoma, pero son reconstruidos para formar una Ig madura a lo largo del desarrollo del linfocito B (Figura 23.5). En la cadena pesada, el gen V codifica las regiones CDR1 y CDR2, mientras que la región CDR3 es codificada por un mosaico entre el extremo 3′ del gen V, seguido por la secuencia completa de los genes D y J. Por último, el dominio constante, que determina la clase de la Ig, es codificado por el gen C. Por tanto, cuatro genes diferentes V, D, J y C se recombinan para formar una cadena pesada funcional. De manera similar, las cadenas ligeras son codificadas por la recombinación de los genes de la cadena ligera V, J y C.

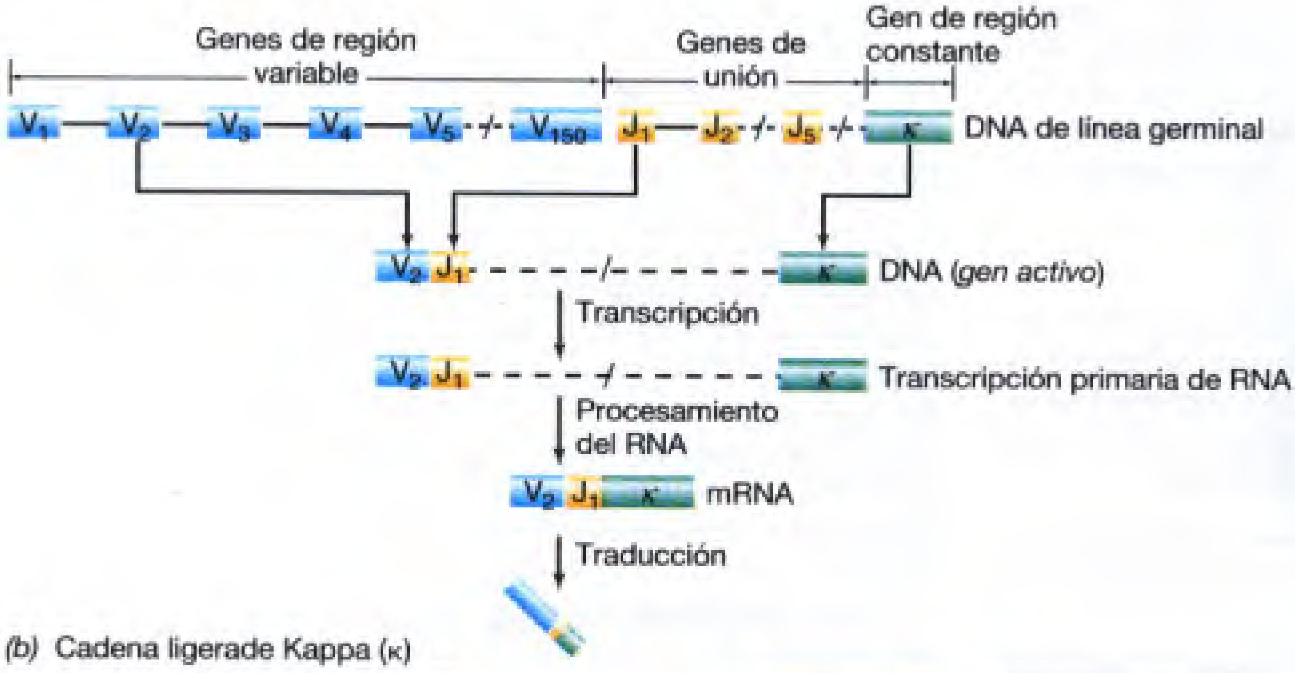
Cada linfocito que se desarrolla en la médula ósea a partir de una célula madre hematopoyética dispone de los genes requeridos para formar todas las Igs. Como se muestra en la Figura 23.5, cada célula B dispone, aproximadamente de 150 genes V de la cadena ligera colocados en tandem así como 5 genes J; en cuanto a la cadena pesada, dispone de 200 genes V en tandem, 50 genes D y 4 genes J. Además, no hay que olvidar los dominios constantes de las cadenas ligera y pesada (C_L y C_H). Los genes V, D J y C están separados por regiones no codificantes (intrones) elemento típico de los reagrupamientos génicos en eucariotas (Sección 7.12). Durante la maduración de los linfocitos B, se produce una recombinación génica singular en cada uno de ellos, se seleccionan al azar segmentos V, D y J que se fusionan gracias a la intervención de enzimas que eliminan todo el DNA no elegido, dando lugar a un gen que codifica una cadena pesada activa. El gen resultante (que contiene una secuencia VDJ y el segmento C) se transcribe, el RNA se procesa para producir un mRNA maduro que produce las cadenas pesada y ligera de las molécula de inmunoglobulina.

Diversidad somática

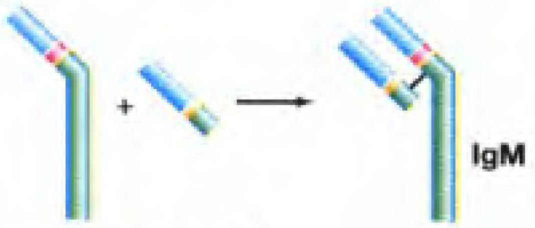
Según lo expuesto hasta este momento, toda la diversidad de las Ig ha sido generada como consecuencia de la recombinación de genes ya existentes. Sin embargo, los procesos *somáticos* también son importantes a la hora de generar diversidad. Los genes de la cadena pesada y ligera expresados por un determinado linfocito B manifiestan una importante dependencia del *surtido* de cadenas ligeras y pesadas disponibles. Por ejemplo, basándose en el número de genes del *loci* de la cadena ligera kappa (κ), hay 150V × 5J posibles agrupamientos, es decir, 750 posibles cadenas ligeras. En cuanto al *loci* de la cadena pesada, hay aproximadamente 200V × 50D X 4J, es decir, 4000 posibles cadenas pesadas. Asumiendo que cada cadena pesada o ligera tiene una misma probabilidad de ser expresada, tenemos 750 × 4000, o lo que es lo mismo, 3 000 000 posibles anticuerpos diferentes que pueden expresarse (Figura 23.5).


Genes de región variable
Genes de diversidad
Genes de unión
Genes de región constante
V₁
V₂
V₃
V₄
V₅
V₂₀₀
D₁
D₂
D₃
J₁
J₂
J₄
μ
δ
γ
ε
α
Intrones
DNA de línea germinal
Formación de un *gen activo* durante el desarrollo del linfocito (recombinación somática)
V₃ D₁ J₂
DNA (*gen activo*)
Transcripción
Transcripción primaria de RNA
Procesamiento del RNA
mRNA
Traducción

(a) Cadena pesada de IgM


Genes de región variable
Genes de unión
Gen de región constante
V₁
V₂
V₃
V₄
V₅
V₁₅₀
J₁
J₂
J₅
κ
DNA de línea germinal
V₂ J₁
DNA (*gen activo*)
Transcripción
Transcripción primaria de RNA
Procesamiento del RNA
mRNA
Traducción

(b) Cadena ligerade Kappa (κ)



(c) Suma de A y B

Figura 23.5 Reorganización de un gen de inmunoglobulina en una célula B humana. Los genes de las inmunoglobulinas están organizados en tandem en tres cromosomas diferentes. (a) El complejo de los genes de la cadena pesada (H) en el cromosoma 14. Las cajas rellenas representan los genes que codifican las inmunoglobulinas. Las líneas discontinuas indican las secuencias que intervienen (no están a escala). (b) El complejo kappa (κ) de la cadena ligera está en el cromosoma 2. Los genes lambda (λ) de la cadena ligera están en un complejo similar en el cromosoma 22. (c) Ensamblaje de la mitad de la molécula de un anticuerpo.

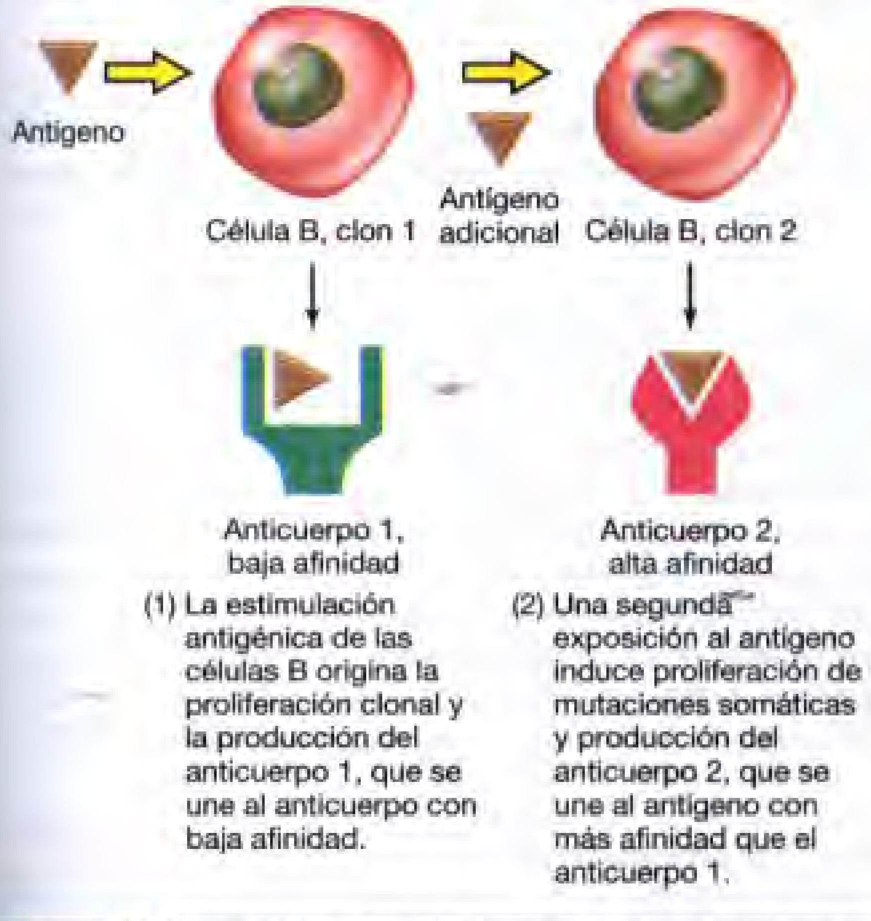
Otro mecanismo de generación somática de diversidad es el relacionado con la unión del DNA. La unión del DNA de las regiones V-D-J o V-J es impreciso y frecuentemente presenta variaciones de algunos nucleótidos en el lugar donde se producen las fusiones VDJ (o VJ). Esta imprecisión genética es suficiente para producir el cambio de uno o dos aminoácidos, lo que determina una diversidad aún mayor en el registro de anticuerpos. En cada célula B, sin embargo, solamente tiene lugar una única reorganización en los genes de la cadena ligera y pesada. Este principio de *exclusión alélica* asegura que *cada célula B produzca una única Ig.*

Hipermutación

Existe otro mecanismo adicional para generar diversidad en los anticuerpos mediante *hipermutación somática* de las células B, los genes de las inmunoglobulinas muestran un nivel de mutaciones muy superior al del resto de los genes. La hipermutación somática de los genes de las Ig es particularmente llamativa después de la segunda exposición a un antígeno inmunizante. Como ya hemos visto, una segunda exposición a un antígeno produce un cambio en la clase predominante de anticuerpos producidos, con un cambio en la producción de IgM a IgG (Sección 22.9). Además, el fenómeno de cambio de clase va acompañado frecuentemente por un aumento de la fuerza de unión entre el anticuerpo y el antígeno (afinidad). Esta *maduración en la afinidad* es uno de los factores responsable del dramático aumento de intensidad que se produce en la respuesta inmunitaria secundaria (Sección 22.9 y Figura 22.19).

La evidencia experimental del aumento de afinidad de los anticuerpos por mutación somática se consiguió mediante el estudio de las *abismas*, anticuerpos que presentan actividad enzimática. Las abzimas llevan a cabo reacciones enzimáticas en los sustratos que unen, dando lugar a modificaciones covalentes en el sustrato y la formación de un producto. Los mecanismos de las abzimas parecen ser idénticos a los mecanismos que presentan las reacciones enzima-sustrato (Sección 5.5). Desafortunadamente, la mayoría de las abzimas tienen una afinidad muy baja por el sustrato, y, por tanto, una escasa eficiencia en la transformación a producto. Sin embargo, cuando un clon de células B productor de abzimas es reexpuesto a un antígeno (inmunización secundaria) la afinidad de las abzimas se incrementa dramáticamente (Figura 23.6). Después de repetidas inmunizaciones, algunas abzimas son capaces de unir el sustrato con una afinidad 10 000 veces superior a la abzima/anticuerpo original.

Estudios hechos en linfocitos B que evolucionan hacia la producción de una abzima mejor, después de una serie de inmunizaciones, revelan que mutaciones en los genes de la región V, tanto de la cadena ligera como de la pesada, se pueden correlacionar con el aumento en la afinidad por el sustrato que experimenta el clon final de abzima. Así pues, el antígeno actúa como un agente de selección, y casa dosis sucesivas de antígeno, e induce mutaciones somáticas que producen un sucesivo incremento en la respuesta de los anticuerpos. Uniendo el fenómeno de mutación somática con los demás mecanismos de generación de diversidad, se puede concluir que la capacidad de generación de diversidad de los anticuerpos de un individuo es casi ilimitada.



(1) La estimulación antigénica de las células B origina la proliferación clonal y la producción del anticuerpo 1, que se une al anticuerpo con baja afinidad.

(2) Una segunda exposición al antígeno induce proliferación de mutaciones somáticas y producción del anticuerpo 2, que se une al antígeno con más afinidad que el anticuerpo 1.

Figura 23.6 Las abzimas son anticuerpos con actividad enzimática. La inmunización primaria con un antígeno induce la producción de anticuerpos con baja afinidad, como los producidos por el clon 1. Inmunizaciones posteriores con el mismo antígeno producen la selección de las mutaciones somáticas del clon 1 que presentan una mayor afinidad por el antígeno, como ocurre en el clon 2. Esto parece un fenómeno universal para todos los anticuerpos: existe un mecanismo que produce hipermutación somática en los genes de los anticuerpos funcionando continuamente. El antígeno actúa como la fuerza selectora que elige los clones y anticuerpos que reaccionan más fuertemente con él.

✓ 23.5 Revisión de conceptos

La recombinación permite el intercambio de las distintas piezas de los genes finales de las inmunoglobulinas. La reorganización al azar de los genes de la cadena ligera y pesada maximiza la generación de diversidad. Mecanismos somáticos, entre los que se incluyen la hipermutación, también contribuyen sustancialmente a la diversidad de las inmunoglobulinas.

- ✓ Describa los distintos fenómenos de recombinación que produce un gen maduro de la cadena pesada.
- ✓ ¿Cuántos sitios de unión de inmunoglobulinas posibles pueden producirse?

IV LOS RECEPTORES DE LAS CÉLULAS T

Los receptores de las células T o TCRs se encuentran como antígenos de superficie en los linfocitos T donde están encargados de reconocer péptidos antigénicos embebidos o presentados por las proteínas del MHC (Sección 22.4). En la presente sección vamos a analizar la estructura, la función de unión al antígeno y la organización génica de los TCRs.

23.6 Las proteínas del TCR y la unión al antígeno

El **TCR** es una proteína integral de membrana que se encuentra exclusivamente en la superficie de los linfocitos T. El TCR está formado por dos polipéptidos, la cadena alfa (α) y la cadena (β). La cadena α tiene un peso molecular aproximado de 27 000 y la β en torno a 31 000. El dímero α:β del TCR es capaz de unir específicamente péptidos antigénicos que se encuentren embebidos (que sean presentados) en las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APCs) o en las células diana (Sección 22.5). Por tanto, *el TCR se une tanto al péptido extraño como al MHC propio*. Los TCRs llevan a cabo esta doble unión a través del denominado sitio de unión, compuesto por los dominios V tanto de la cadena α como de la β. Al igual que las Igs, los dominios V de la cadena α y la β del TCR, contienen los segmentos CDR1, CDR2 y CDR3 que son los responsables directos de la unión al antígeno.

La estructura tridimensional del complejo TCR-péptido-MHC se muestra en la Figura 23.7 Ambos, TCR y MHC se unen directamente al péptido antigénico. La proteína del MHC se une a una cara del péptido, el agrotopo, mientras que el TCR interacciona con la otra cara, el epítopo. Las regiones CDR están directamente involucradas en la unión

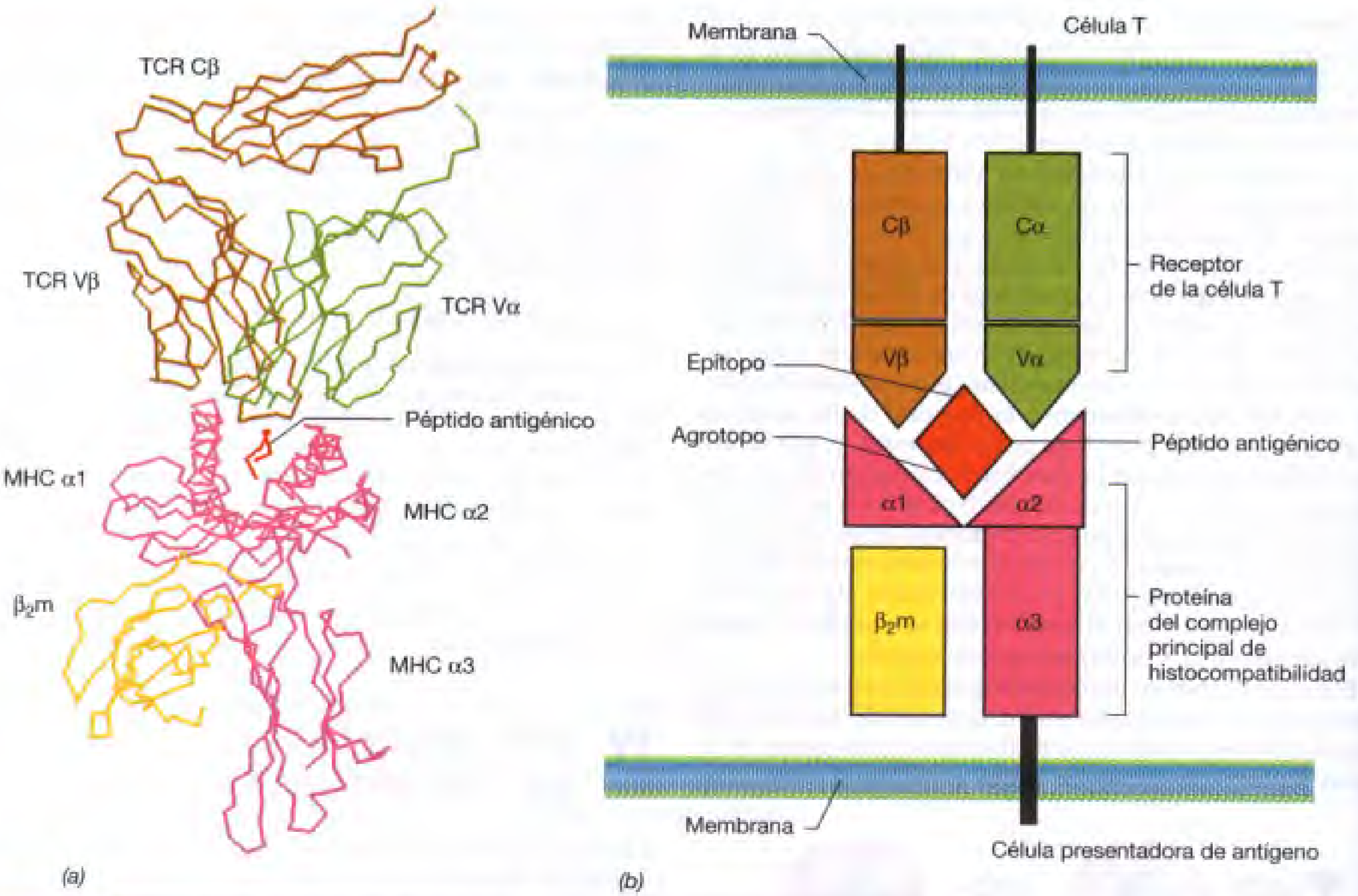


Figura 23.7 El complejo TCR-péptido-proteína del MHC. (a) Estructura tridimensional de cintas donde se muestra la orientación del TCR, el péptido (rojo) y el MHC. Esta estructura proviene de los datos depositados en el *Protein Data Bank*. (b) Interpretación de la estructura del complejo MHC-péptido-TCR.

del complejo MHC-péptido manifestando, cada una de ellas, una función específica en dicha interacción. Las regiones CDR3, tanto de la cadena α como de la β del TCR, se unen al epítopo del péptido. Las regiones CDR1 y CDR2 de ambas cadenas contactan con las α-hélices de las proteínas MHC responsables de la unión al agrotopo del péptido.

✓ 23.6 Revisión de conceptos

El TCR es una proteína que une péptidos antigénicos presentados por las proteínas del MHC. Las regiones CDR3, tanto de la cadena α como de la β, son las responsables de la unión al epítopo del péptido, mientras que las regiones CDR1 y CDR2 unen a la proteína del MHC.

- ✓ Distingua las funciones de los segmentos CDR1, CDR2 y CDR3 del TCR.
- ✓ Distingua entre un agrotopo y un epítopo.

23.7 Genes del TCR y diversidad

Como los genes de las Igs, los dominios constante y variable, tanto de la cadena α como de la β, del TCR están codificados por distintos genes. Al igual que en las Igs, las regiones V del TCR son codificadas por numerosos genes agrupados en tándem. Las cadenas α disponen aproximadamente de 80 genes V y 611 segmentos de unión J, mientras que la cadena β tiene 50 genes variables (V), 2 genes de diversidad (D) y 13 segmentos de unión (J) (Figura 23.8). Los genes V, D y J de la cadena β y los V y J de la cadena α sufren procesos de recombinación para dar lugar a los genes de la región V funcionales. Adicionalmente, se puede generar diversidad en el TCR por un mecanismo conocido como *diversidad de la región N* que se genera como consecuencia de la adición de entre 1 y 6 nucleótidos entre los segmentos V y D y entre los D y J. Además, la región D de la cadena β se puede transcribir en cualquiera de los tres marcos de lectura posibles dando lugar a tres transcritos diferentes a partir de cada gen de la región D dando lugar, por tanto, a una diversidad mucho mayor a la esperada a partir de los dos genes de segmentos D. Como ya discutimos en los reagrupamientos de las cadenas pesadas y ligeras de las Ig, cada clon de linfocitos T produce al azar cadenas α y cadenas β individuales que se unen para dar lugar al heterodímero α:β. Gracias a todos estos métodos de creación de diversidad, el número potencial de distintos TCRs es enorme, probablemente del orden de 10^{15}.

✓ 23.7 Revisión de conceptos

El dominio V de la cadena β del TCR está codificado por los genes de los segmentos V, D y J. El dominio V de la cadena α del TCR está codificado por genes de los segmentos V y J. La di-

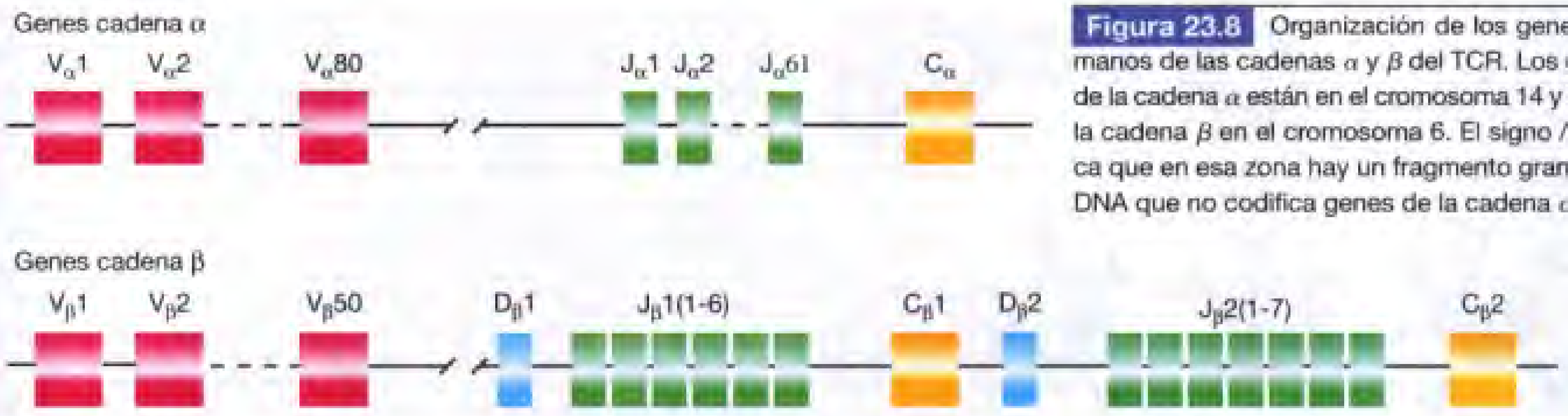


Figura 23.8 Organización de los genes humanos de las cadenas α y β del TCR. Los genes de la cadena α están en el cromosoma 14 y los de la cadena β en el cromosoma 6. El signo // indica que en esa zona hay un fragmento grande de DNA que no codifica genes de la cadena α o β.

versidad generada por recombinación, reagrupamiento de los productos génicos, posibilidad de transcripción de los segmentos D en los tres posibles marcos de lectura, y la adición al azar de N-nucleótidos asegura una cantidad ilimitada de posibilidades de diferentes TCRs.

- ✓ Explique las contribuciones a la diversidad de la lectura de la región D en los tres diferentes marcos de lectura.
- ✓ Explique las contribuciones a la diversidad del TCR de las adiciones a las regiones N.

V SEÑALES MOLECULARES E INMUNIDAD

Hasta el momento, en el presente capítulo, hemos explorado los detalles de los genes y las proteínas involucrados en el reconocimiento de antígenos. El reconocimiento del antígeno es *la primera señal* y el proceso más importante en la activación específica de los linfocitos B y T, pero otras señales moleculares han de ser transmitidas a los linfocitos antes de que éstos sean capaces de producir una reacción apropiada frente al antígeno. En el presente apartado examinaremos algunos de los mecanismos moleculares que controlan la activación de la respuesta inmunitaria. En un primer momento examinaremos los mecanismos que determinan que las células reaccionen contra antígenos extraños e ignoren las proteínas propias. Después, analizaremos las señales moleculares *secundarias* responsables de activar a los linfocitos T. Por último, hablaremos sobre *citocinas* y *quimioquinas*, moléculas solubles capaces de activar células dentro de una respuesta inmunitaria.

23.8 Selección clonal y tolerancia

En esta sección examinaremos el mecanismo de selección de las células T para desarrollar una respuesta inmunitaria efectiva. Los linfocitos T deben aprender a discriminar entre *antígenos peligrosos extraños (no propios)* y *antígenos inocuos propios* que componen nuestros tejidos corporales. Así pues, los linfocitos T deben desarrollar **tolerancia** o ausencia de respuesta frente a los antígenos propios. El hecho de que manifestemos tolerancia ante lo propio, implica que seleccionamos las células inmunitarias que interaccionan exclusivamente con los antígenos peligrosos no propios.

Selección clonal

La hipótesis de la **selección clonal**, que intenta explicar el fenómeno de la tolerancia, se basa en que cada linfocito B o T dispone de un receptor de superficie específico para un único antígeno. Cuando un linfocito es estimulado por la interacción con el antígeno se desarrolla y diferencia produciendo, como resultado, un conjunto de células que expresan en superficie un receptor con la misma especificidad por el antígeno. Estas copias de la célula original que interaccionó con el antígeno se conocen como *clones* (Figura 23.9). Las células que no han interaccionado con el antígeno no son capaces de proliferar.

Para responder a la casi infinita variedad de antígenos, el cuerpo necesita generar una inmensa variedad de células reactivas frente a ellos, cada una de las cuales a de ser capaz de proliferar en respuesta a la presencia del antígeno. Sin embargo, estas células reactivas frente a la presencia de antígenos no deben producir reacciones inmunitarias frente a los antígenos propios del huésped. Para poder cumplir estos dos requisitos, el sistema inmunitario está programado para seleccionar aquellos clones útiles frente a antígenos extraños y eliminar o suprimir aquellos otros clones reactivos frente a los antígenos propios.

Selección de los linfocitos T y tolerancia

Las células T sufren *selección a favor* de aquellas células reactivas frente a un antígeno y *selección contra* los clones que reaccionan con los propios antígenos. La selección contra los clones autorreactivos tiene como resultado la *tolerancia*, o ausencia específica de respuesta inmunitaria. Previamente hemos discutido como los fallos en la tolerancia desencadenan fenómenos de autoinmunidad (Sección 22.13).

La selección de los linfocitos T tiene lugar en el timo, órgano linfoide primario que desempeña un papel central en el desarrollo de los linfocitos T (Figura 22.2).

Los linfocitos inmaduros abandonan la médula ósea y llegan al timo a través de los conductos linfáticos (Figura 23.10). En una primera fase de maduración de los linfocitos T en el timo, conocida como **selección positiva**, las células T inmaduras interaccionan con el epitelio tímico a través de su recién desarrollado TCR uniéndose a la las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Las células T que no unen a las proteínas del MHC sufren una muerte programada **(apoptosis)**; por el contrario, las células T que unen las proteínas del MHC tímico continúan creciendo. Por tanto, la selección positiva retiene las células T

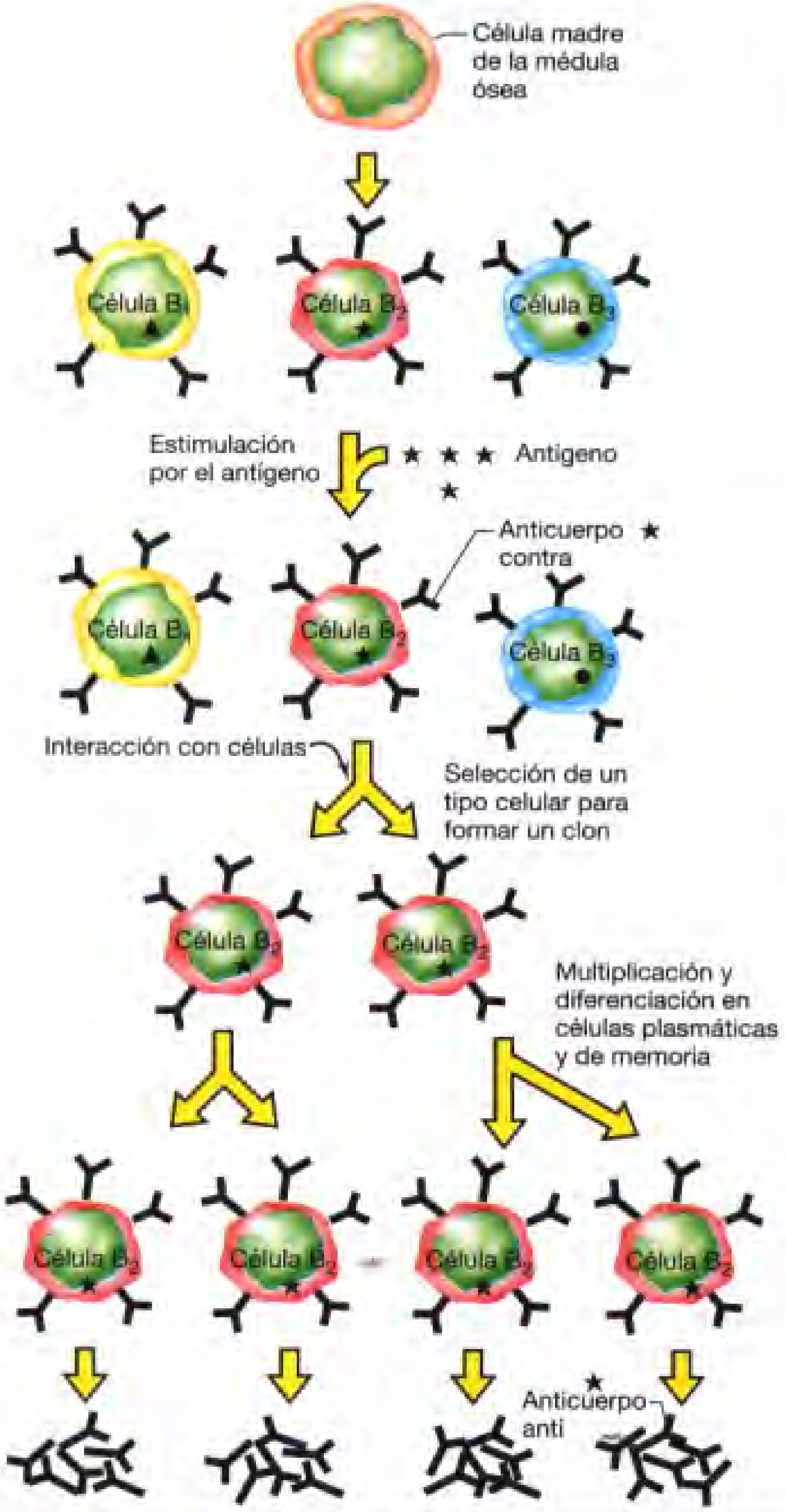

Célula madre de la médula ósea
Célula B_1
Célula B_2
Célula B_3
Estimulación por el antígeno
★ ★ ★ Antígeno
Anticuerpo contra ★
Interacción con células
Selección de un tipo celular para formar un clon
Multiplicación y diferenciación en células plasmáticas y de memoria
Anticuerpo anti ★

Figura 23.9 Selección clonal. Células B individuales, específicas para un único antígeno, después de su interacción con éste, proliferan y se expanden para formar un clon. El antígeno específico funciona como el agente selector, dirigiendo la selección y, por tanto, la proliferación de una célula B específica frente a ese antígeno. Las copias clónicas de la célula reactiva frente al antígeno disponen de un receptor de superficie de una célula B con idéntica especificidad por el antígeno. La exposición continuada al antígeno da como resultado la continua expansión del clon. Situación análoga es manifestada por los linfocitos T.

que reconocen las proteínas del MHC propio y elimina (deleccciona) las que no lo reconocen.

La segunda fase de la maduración de los linfocitos T se conoce como **selección negativa**. Después de haber sufrido la selección positiva, las células que la han superado son expuestas a las proteínas del MHC tímico, pero ahora están acomplejadas con antígenos (Sección 22.5). Los antígenos del timo son de origen propio. Las células T que reaccionan con los antígenos propios del timo son potencialmente peligrosas porque pueden producir la eliminación de los tejidos propios (autoinmunidad). Por tanto, esas células T autorreactivas deben ser eliminadas. Las células T autorreactivas se unen muy fuertemente al timo y eventualmente mueren. Sin embargo, las células T que no reaccionan con los antígenos propios no se unen tan fuertemente, presumiblemente porque los antígenos extraños no están en el timo. Estas células T no mueren, abandonan el timo y migran al bazo y nódulos linfáticos donde pueden entrar en contacto con los antígenos extraños presentados por los linfocitos B u otras células presentadoras de antígeno.

Este mecanismo en dos fases para seleccionar los linfocitos T reactivos frente a antígenos extraños y que a la vez induce tolerancia se conoce como **delección clonal**; los precursores de linfocitos T que son inútiles o peligrosos mueren y más del 99% de las células T que entran en el timo y sufren la selección clonal no sobreviven.

Las células T que sobreviven a la selección positiva y negativa abandonan el timo, viajan a los órganos linfoides secundarios y allí pueden participar en la respuesta inmunitaria frente a los antígenos extraños.

Tolerancia de los linfocitos B

La adquisición de la tolerancia inmunitaria por parte de las células B también es necesaria porque los anticuerpos producidos por células B autorreactivas (autoanticuerpos) pueden dañar los tejidos del huésped (Sección 22.13). Las células B también sufren delección clonal. Muchas células B autorreactivas son eliminadas durante su desarrollo en la médula ósea, el órgano linfoide primario responsable del desarrollo de las células B en humanos (Sección 22.1). Además, *la anergia clonal* (ausencia de respuesta) también desarrolla un papel; células inmaduras que son autorreactivas no se desarrollan, incluso cuando son expuestas a altas concentraciones de autoantígenos en la médula ósea. Estos antígenos pueden ocupar los sitios reactivos de las Ig de superficie del linfocito B, pero la activación de los linfocitos B es dependiente de la «ayuda» por parte de los linfocitos T, como veremos más adelante (Sección 23.10). Si no hay células T disponibles reactivas frente al antígeno, ya que han sido eliminadas durante la selección de los linfocitos T, las células B permanecen en un estado constante de anergia.

✓ 23.8 Revisión de conceptos

El timo es el órgano linfoide primario que proporciona un ambiente apropiado para la maduración de los linfocitos T. Las células T inmaduras que no interaccionan con las proteínas del MHC (selección positiva) o reaccionan fuertemente con antígenos propios (selección negativa) son eliminados por *delección clonal* en el timo. Las células T que sobreviven a la selección positiva y negativa abandonan el timo y pueden participar en una respuesta inmunitaria efectiva. Las células B también sufren delección clonal y selección.

- ✓ Dé un ejemplo de una proteína propia frente a la cual usted es tolerante y otra proteína humana frente a la que no lo es.
- ✓ Distinga entre selección positiva y negativa de las células T.

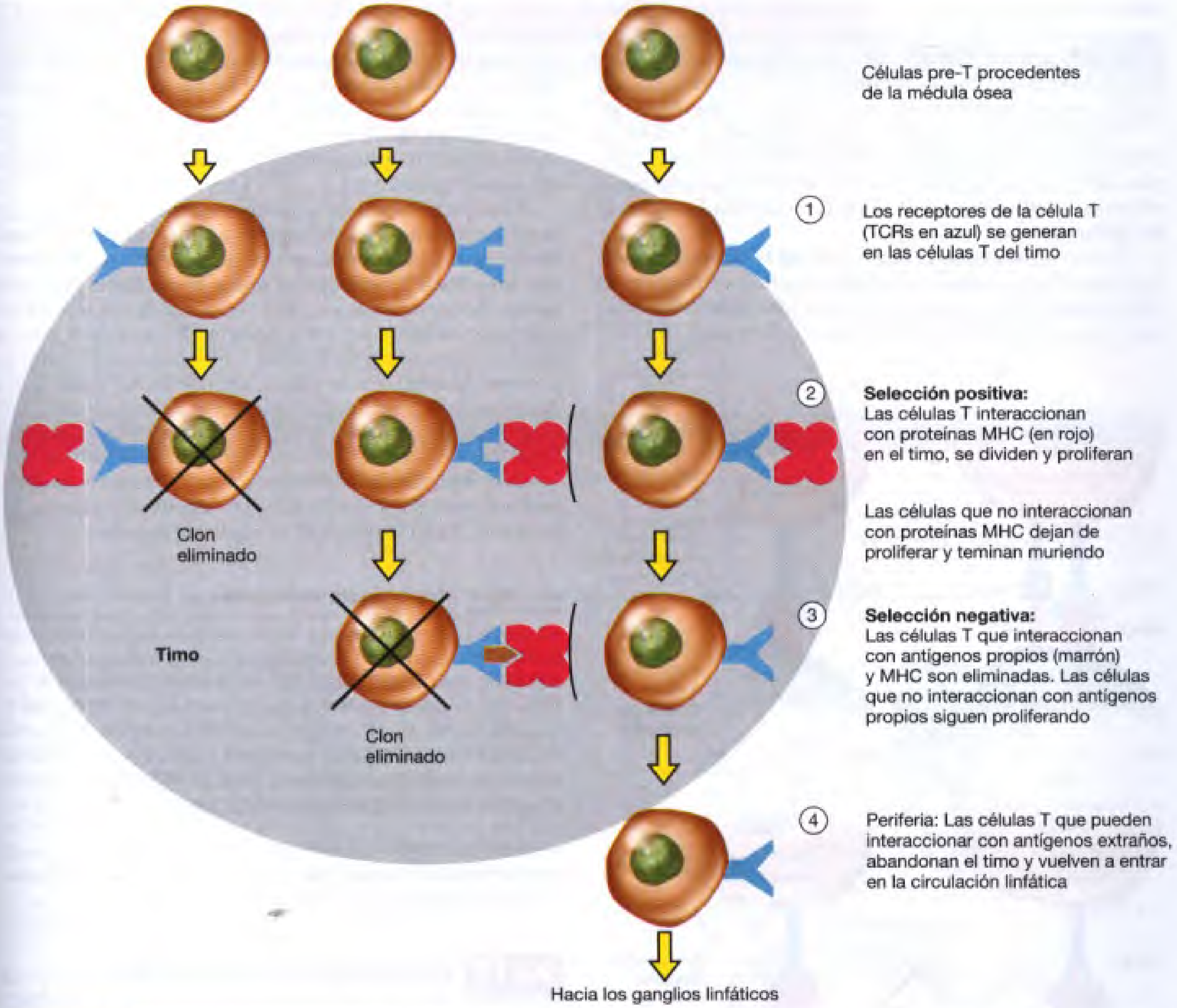

Células pre-T procedentes
de la médula ósea
①
Los receptores de la célula T
(TCRs en azul) se generan
en las células T del timo
②
Selección positiva:
Las células T interaccionan
con proteínas MHC (en rojo)
en el timo, se dividen y proliferan
Las células que no interaccionan
con proteínas MHC dejan de
proliferar y teminan muriendo
Clon
eliminado
③
Selección negativa:
Las células T que interaccionan
con antígenos propios (marrón)
y MHC son eliminadas. Las células
que no interaccionan con antígenos
propios siguen proliferando
Timo
Clon
eliminado
④
Periferia: Las células T que pueden
interaccionar con antígenos extraños,
abandonan el timo y vuelven a entrar
en la circulación linfática
Hacia los ganglios linfáticos

Figura 23.10 Selección de las células T y delección clonal. Los linfocitos T sufren una selección por pasos en el timo. ① Células pre-T entran en el timo y expresan el receptor de célula T (TCRs). ② Las células T se seleccionan por su capacidad de unirse a las proteínas del MHC del timo. Las células que no se unen al final mueren, proceso conocido como *selección positiva*. ③ Algunas de las células T seleccionadas positivamente pueden interaccionar con antígenos propios en el timo. Las células que manifiestan esta interacción con autoantígenos son deleccionadas en el timo, un proceso llamado *selección negativa*. ④ Las células T que sobreviven a la selección positiva y negativa abandonan el timo. Los TCRs de las células seleccionadas son capaces de interaccionar con antígenos extraños fuera del timo.

23.9 Señales secundarias

Las células T seleccionadas en el timo por ser capaces de reaccionar frente a antígenos extraños potencialmente peligrosos son también seleccionadas por su ausencia de respuesta frente a los antígenos propios; las células T que reaccionan con antígenos propios son deleccionadas en el timo. Sin embargo, una gran cantidad de antígenos propios no se expresan en el timo. Por este motivo, clones de células T autorreactivas pueden escapar de la delección clonal, pero pueden no responder frente a los antígenos propios debido a interacciones en los órganos linfoides secundarios. La clave de la ausencia de respuesta de estos clones autorreactivos o lo que es lo mismo, *anergia clonal*, la encontramos en el mecanismo de activación de las células T.

Señales secundarias y activación de células T

Cuando una célula T madura abandona el timo, se dirige a los órganos linfoides secundarios (nódulos linfáticos, bazo y tejido linfoide asociado a mucosas también conocido como

MALT) donde se instauran. Estas células T no han sido nunca expuestas a antígeno y, por tanto, se denominan *naive* o no comprometidas. Las células T *naive* deben ser activadas por células presentadoras de antígeno (APCs) (Sección 22.5) antes de ser totalmente competentes como células efectoras.

El primer paso en la activación de una célula T *naive* es la unión del TCR al complejo MHC-péptido en la APC (Figura 23.11). Ésta es la señal 1, la cual es absolutamente esencial para la activación, sin la señal 1, una célula T no puede ser activada.

El paso siguiente en la activación de la célula T necesita la activación de otras dos proteínas, una localizada en la APC y llamada B_7, y otra que se encuentra sólo en las células T, llamada CD28. La interacción y unión de B7 a CD28 es la señal 2 y activa a la célula T. En ausencia de la señal 2, la célula T no puede ser activada (Figura 23.11). La célula T activada, se convierte en una célula efectora. Una célula T_C activada puede matar cualquier célula diana que muestre el antígeno, incluso aunque dicha célula diana no disponga de CD28. Células efectoras activadas solamente necesitan la señal 1 (péptido-MHC) para estimular su actividad efectora (Figura 23.11).

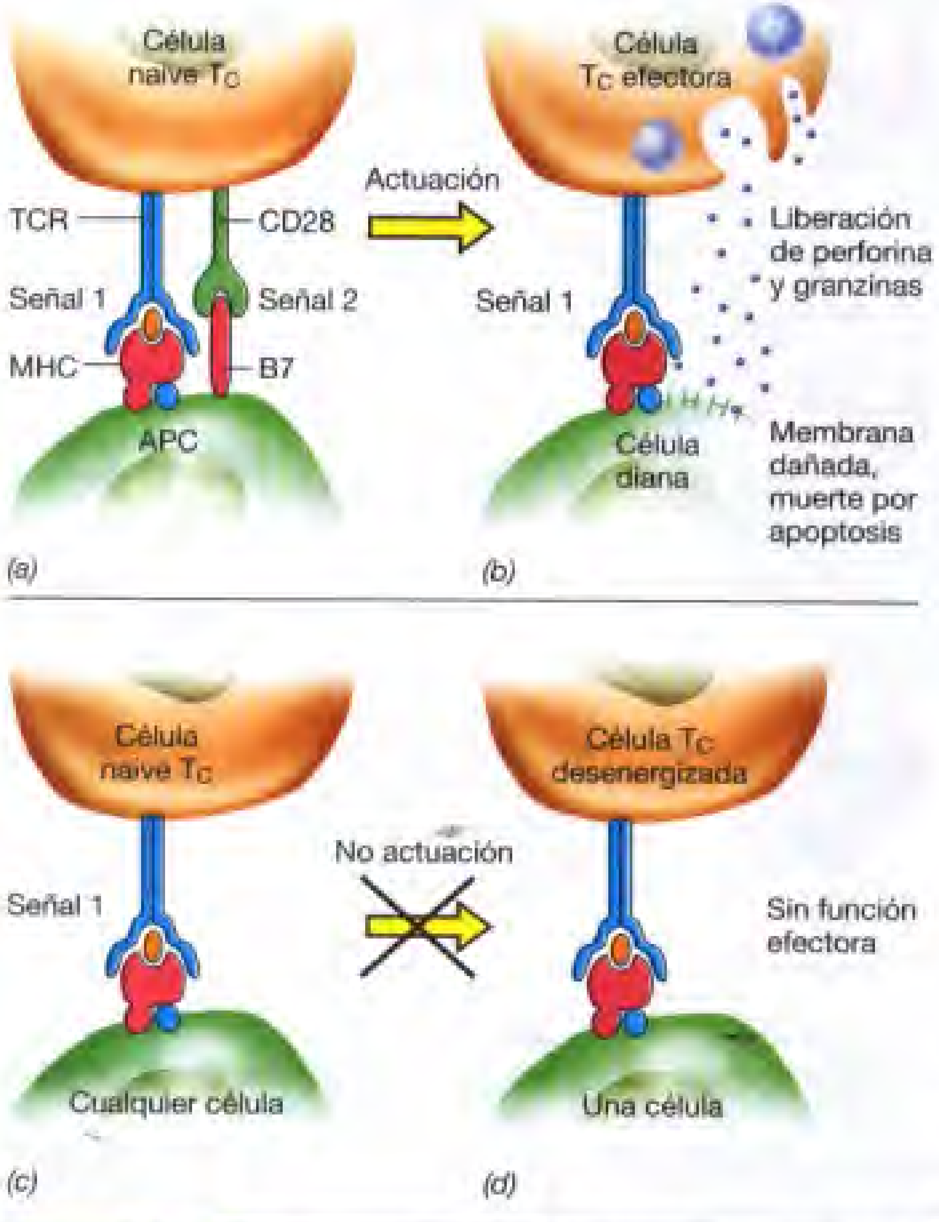


Figura 23.11 Para activar linfocitos T naive son necesarias la señal 1 y la señal 2. (a) Una célula T_c naive interacciona vía su TCR con el complejo MHC:péptido de APC. Esta es la señal 1. La célula T_c además tiene una proteína llamada CD28 capaz de interaccionar con la proteína B7 de la APC. Esta es la señal 2. La interacción simultanea de la célula T_c y la APC vía señal 1 y señal 2 activa a la célula T naive. (b) esta célula T_c permanentemente activada es capaz de eliminar a las células diana únicamente recibiendo la señal 1. (c) Una célula T_c naive interacciona a través de su TCR con el complejo MHC:péptido de cualquier célula. Aunque exista señal 1 (interacción del TCR con el complejo MHC:péptido) la señal 2 no puede ser generada porque únicamente las APC disponen de la proteína B7. (d) En ausencia de la señal 2, la célula T_c naive sufre un proceso de anergia permanente.

El requerimiento de una segunda señal de activación tiene importantes implicaciones en los procesos de establecimiento y mantenimiento de la anergia clonal. Por ejemplo, una célula T *naive* que reconoce un antígeno propio de forma independiente a la APC, sólo recibirá la señal 1, ya que sólo las APCs tienen la proteína B7 necesaria para la señal 2. En ausencia de la señal 2, este linfocito T_C sufre un proceso de anergia y no puede ser activado (Figura 23.11). Así pues, la segunda señal dada por la interacción B7:CD28 es un requerimiento absoluto para la activación; ausencia de señal 2 en presencia de señal 1 induce anergia permanente.

Una segunda señal diferente y unos efectores inmunitarios distintos son empleados en la activación de los linfocitos B, como veremos en la siguiente sección.

✓ 23.9 Revisión de conceptos

La mayoría de las células T autorreactivas son deleccionadas durante el desarrollo y la maduración en el timo. Las células T *naive* son activadas en los organos linfoides secundarios, primero por la unión al MHC:péptido mediante el TCR (señal 1), seguido por la unión de la proteína B7 del APC a la proteína CD28 del linfocito T (señal 2). Celulas T *naive* autorreactivas sufren un proceso de anergia en los órganos linfoides secundarios si reciben la señal 1 en ausencia de la señal 2.

- ✓ Defina las señales 1 y 2 de una célula T *naive*.
- ✓ Identifique la señal/señales necesarias para inducir la función efectora de una célula T activada.

23.10 Citoquinas y quimioquinas

Para que las células del sistema inmunitario se activen han de comunicarse entre ellas y una segunda forma general de activación es a través de las proteínas solubles denominadas **citoquinas**. Las citoquinas son un conjunto de proteínas solubles, producidas por los leucocitos y encargadas de regular la actividad de las células. Las citoquinas producidas por los linfocitos se las conoce como *linfocinas*. En general, las citoquinas son secretadas por una célula y se unen a los receptores específicos en una célula diana. Algunas citoquinas se unen a receptores en la propia célula que las ha producido; por esta razón, estas citoquinas tienen funciones *autocrinas* (autoestimuladoras). Los receptores de citoquinas son responsables de la transducción de señales (Sección 8.10). Los receptores de citoquinas, cuando unen la citoquina, dirigen la señal hacia el interior celular y modulan actividades tales como síntesis de proteínas o división celular. Estas señales pueden, como último resultado, dar lugar a crecimiento celular, diferenciación y proliferación clonal.

TABLA 23.1 Propiedades de las citoquinas más importantes

Citoquina	Productores	Dianas principales	Efecto
IL-1[a]	Monocitos	T_H	Activación
IL-2	Células T activadas	Células T	Crecimiento, diferenciación
IL-3	T_H1	Células madre hematopoyéticas	Factor de crecimiento
IL-4	T_H2	Células B	Síntesis de IgG1 e IgE
IL-5	T_H2	Células B	Síntesis de IgA
IL-10	T_H2	T_H1	Inhibición T_H1
IL-12	Macrófagos	T_H1	Diferenciación, activación
IFN-α[b]	Leucocitos	Células normales	Antiviral
IFN-γ	T_H1	Macrófagos	Activación
GM-CSF[c]	T_H1	Células madre mieloides	Diferenciación a granulocitos, monocitos
TGF-β[d]	T_H1 and T_H2	Macrófagos	Inhibición de la activación
TNF-α[e]	T_H1	Macrófagos	Activación
TNF-β	T_H1	Macrófagos	Activación
Quimioquinas			
IL-8	Macrófagos, fibroblastos y queratinocitos	Neutrófilos, células T	Atractor y activador
MCP-1[f]	Macrófagos, fibroblastos y queratinocitos	Macrófagos, células T	Atractor y activador

[a] IL, interleucina; [b] IFN, interferón; [c] CM-GSF, factor de estimulación de colonias de granulocitos y monocitos; [d] TGF, factor de crecimiento de células T; [e] TNF, factor de necrosis tumoral; [f] MCP, proteína quimioatrayente de macrófagos.

Dentro de las citoquinas, hay un grupo que se denomina *interleuquinas* (IL) debido a que son moléculas que median interacciones entre leucocitos. En la Tabla 23.1, se detallan algunas de las más importante citoquinas, las células que las producen, las células diana y el efecto biológico que determinan. Existen alrededor de 40 citoquinas diferentes en total, la mayoría producidas por linfocitos T colaboradores o monocitos y macrófagos. Vamos a examinar la acción de tres citoquinas involucradas en la inducción de una respuesta inmunitaria mediada por la producción de un anticuerpo específico frente a un antígeno.

IL-1, IL-2 e IL-4

Como ya hemos visto, los macrófagos son responsables de la toma, procesamiento y presentación del antígeno (Sección 22.5). Además, los macrófagos secretan una potente citoquina IL-1 con efectos sobre distintos tipos celulares (Tabla 23.1 y Figura 23.12). IL-1 es un componente clave de la respuesta inmunitaria porque es responsable de la activación de las células T_H. Dada la proximidad de macrófagos y linfocitos T_H, principalmente T_H2, en los nódulos linfáticos, les hace ser candidatos para la activación por IL-1.Cuando IL-1 se une a sus receptores (IL-1R) en los linfocitos T_H2, produce la activación de éstos, los cuales, en respuesta, producen IL-2 que es secretado y se une a su receptor IL-2R que se encuentra en los propios linfocitos T_H2 (así pues, IL-2 es autocrino). IL-2 puede activar a la propia célula que lo produce, dividiéndose y generando copias clonales de estos linfocitos. Durante este proceso, la célula T_H2 también produce otras citoquinas, tal es el caso de IL-4, que se une a IL-4R en la superficie de los linfocitos B. El complejo IL-4:IL-4R estimula a las células B a diferenciarse a células plasmáticas, su función última es la de producir

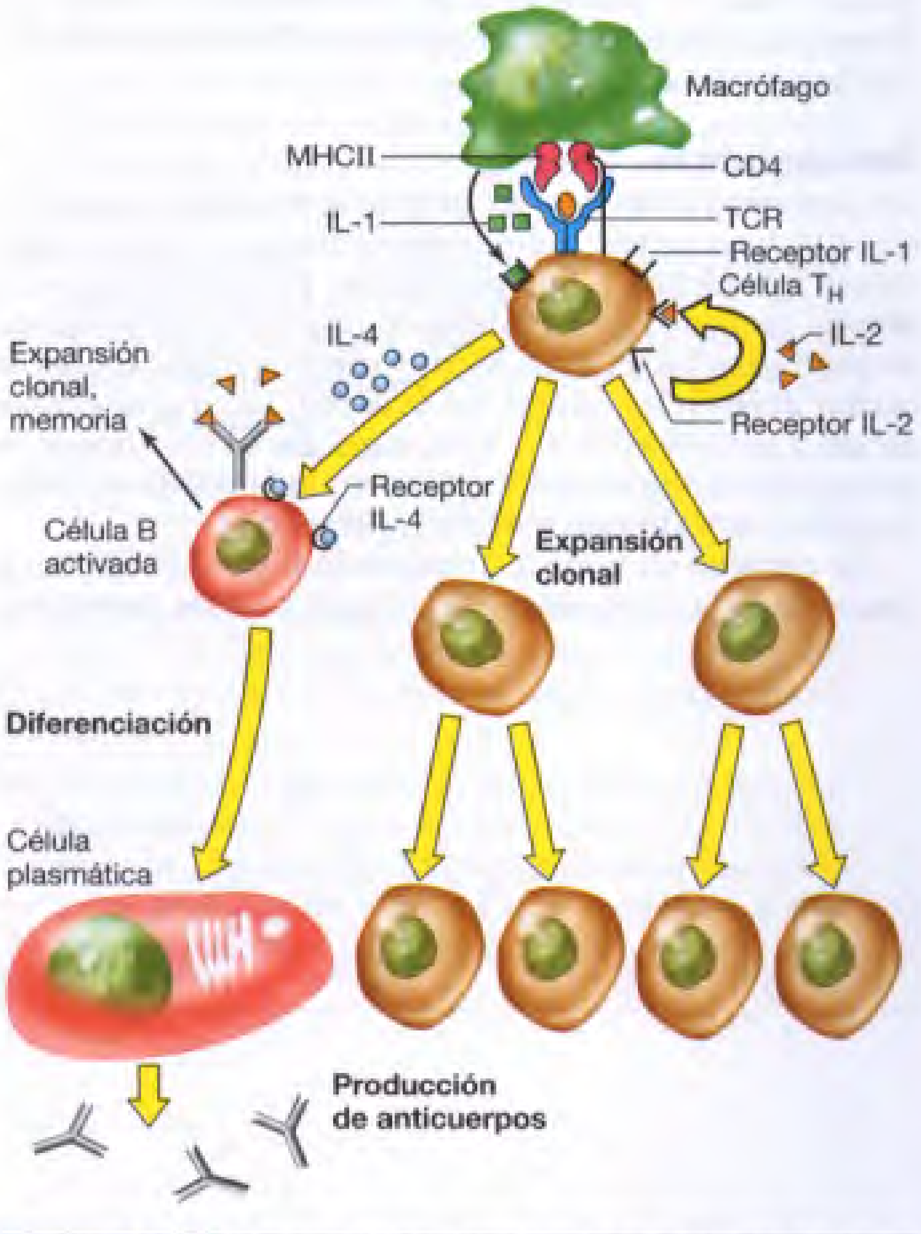


Figura 23.12 Algunos de los efectos más importantes e interacciones de las citoquinas IL-1, IL-2 e IL-4 en la respuesta de producción de anticuerpos.

anticuerpos (Sección 22.9). Por tanto, las citoquinas IL-1, IL-2 e IL-4 son mediadores solubles encargados de activar macrófagos, linfocitos T y células B, los tipos celulares encargados de desarrollar la respuesta inmunitaria dirigida a la generación de anticuerpos.

Otras citoquinas

La Tabla 23.1 muestra la acción de diversas citoquinas. Muchas de estas proteínas modulan a células involucradas en la inmunidad específica. Por ejemplo, IL-4 actúa primariamente sobre los linfocitos B. Sin embargo, algunas citoquinas no afectan a los linfocitos T o B pero sí a otro tipo de células. Estas células activadas por las citoquinas median respuestas inespecíficas muy importantes en el huésped. Tal es el caso de los interferones, (IFN-γ e IFN-α) producidos por los linfocitos y que inhiben la replicación viral y por ende, de prácticamente cualquier célula del cuerpo. Los factores de necrosis tumoral (TNF-α y TNF-β) son capaces de destruir gran variedad de tumores, en el caso de que las células que los producen tengan acceso a esos tumores. Interferones y TNFs parecen no tener especificidad por las células diana, pero son producidos por los linfocitos T y amplifican los efectos de las células inmunitarias.

Las citoquinas son importantes mediadores en una gran variedad de funciones inmunológicas. Unas poseen una amplia actividad, que interaccionan con gran cantidad de tipos de células normales. El rasgo característico de este grupo heterogéneo de proteínas es que todas ellas son producidas por leucocitos.

Quimioquinas

Las **quimioquinas** son un grupo de proteínas pequeñas que funcionan como quimio-atrayentes para células fagocíticas y linfocitos T. Son producidas por linfocitos y otra amplia gama de tipos celulares en respuesta a la presencia de productos bacterianos, virus y otros agentes capaces de causar daño en las células del huésped. Las quimioquinas atraen a los linfocitos T y a los fagocitos al sitio donde se está produciendo el daño, estimulando la respuesta inflamatoria y la respuesta inmune específica.

Se conocen en torno a 40 quimioquinas. Tal vez la más conocida es la *interleucina-8* (IL-8) y *la proteína quimioatrayente de macrófagos 1* (MPC-1) (Tabla 23.1). IL-8 es producida por gran número de tipos celulares incluyendo monocitos, macrófagos, fibloglastos (células del tejido conectivo) queratinocitos (células de la piel) en respuesta a daños en los tejidos o contacto con patógenos. La IL-8 es secretada por las células dañadas y se une a las células del tejido colindante donde actúa como quimioatrayente para células T y neutrófilos (Sección 22.1), que da lugar a una respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos seguida de una respuesta inmunitaria específica determinada por las células T atraídas. Como en el caso de los receptores de las citoquinas, los receptores de las quimioquinas en las células diana actúan a través de rutas de transducción de señales (Sección 8.9) induciendo la activación de los fagocitos diana o de las células T.

MPC-1 también es producido por una importante variedad de células y atrae macrófagos y células T, de nuevo, estimulando la producción de una respuesta inflamatoria y organizando una respuesta inmunitaria específica. Así pues, las quimioquinas son potentes iniciadores de reacciones inflamatorias que determinan el reclutamiento de células T y, por tanto, de una respuesta inmunitaria específica.

✓ 23.10 Revisión de conceptos

Las citoquinas son mediadores solubles producidos por los leucocitos encargados de regular las interacciones entre células. Diferentes citoquinas como ILO-1, IL-2 y IL4 afectan a los leucocitos y son componentes críticos en la generación de una respuesta inmunitaria específica. Otras citoquinas, tales como IFN y TNF, afectan a una amplia variedad de células. *Las quimioquinas* son producidas por una gran variedad de células en respuesta a daños y son potentes atrayentes de células inflamatorias y de linfocitos T.

- ✓ Compare las células diana de IL-1, IL-4, IL12, IFNγ y TNF-β.
- ✓ ¿En qué se diferencian las citoquinas y las quimioquinas respecto a las células que las producen? ¿Y respecto a las células diana?
- ✓ ¿Qué procesos son estimulados por la producción de citoquinas? ¿Qué procesos son estimulados por la producción de quimioquinas?

Preguntas de repaso

1. Defina los criterios empleados para asignar un gen, o la proteína que codifica, a la superfamilia de los genes de las Igs.
2. Identifique los motivos estructurales más importantes de las proteínas del MHC de clase I y clase II.
3. El polimorfismo implica que cada proteína del MHC se una a un motivo peptídico diferente. En el caso del polimorfismo del HLA de clase I, ¿cuántas proteínas distintas pueden ser expresadas por un mismo individuo? ¿Y por la población humana entera?
4. ¿Qué cadenas de las Igs se usan para construir el sitio de unión al péptido? ¿Qué dominios?¿Qué CDRs?
5. Calcule el número total de dominios V_H y V_L que se pueden construir a partir de los genes de Igs disponibles. ¿Cuantas Igs completas pueden producirse como resultado del reagrupamiento de todas las cadenas pesadas y ligeras posibles?
6. Describa la interacción entre el TCR y el complejo entre el MHC y el péptido antigénico. Identifica la función de los CDRs en el TCR.
7. La diversidad del TCR, al igual que las Igs, se puede generar por recombinación y por reagrupación. Sin embargo, la diversidad adicional se puede generar por la adición de nucleótidos en la región N y por la lectura de los segmentos D (diversidad) en los tres distintos marcos de lectura. Explique como funcionan estos mecanismos de generación de diversidad.
8. Explique la selección *positiva* y *negativa* de las células T.
9. ¿Qué interacciones moleculares son necesarias para la activación de linfocitos T *naive*? ¿y para la activación de células efectoras?
10. ¿Cuáles son los principales efectos de las citoquinas y las quimioquinas? ¿cuáles son las principales diferencias entre ellas?

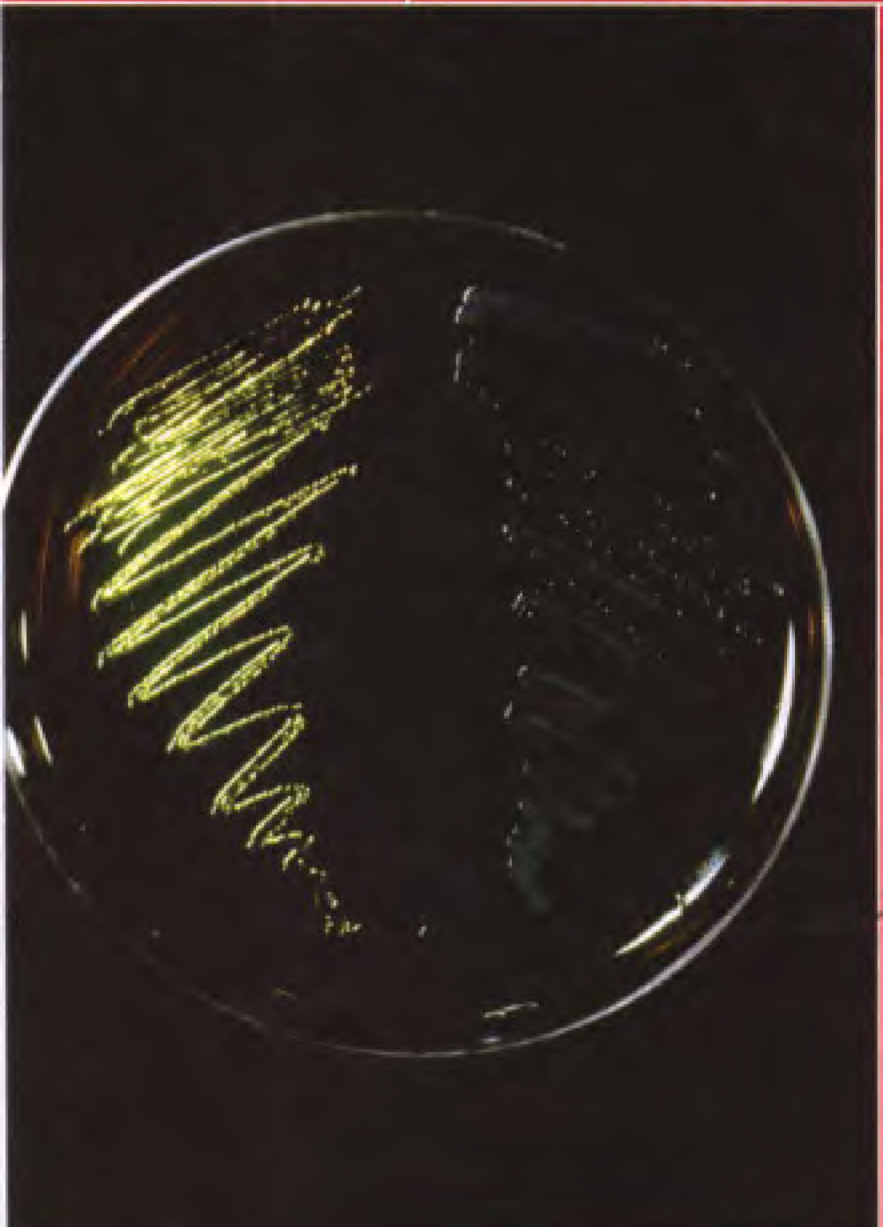
Ejercicios prácticos

1. Construya una tabla en la que aparezcan los elementos comunes de las proteínas codificadas por los genes miembros de la superfamilia de las Igs. Identifique los componentes estructurales que se ajustan a esos elementos comunes dentro de las Igs, TCRs y proteínas del MHC.
2. ¿Cuál es la ventaja potencial de disponer de distintos sitios de unión para proteínas de clase I y clase II? *Pista:* téngase en cuenta la fuente de la que provienen los péptidos antigénicos que se unen a cada proteína.
3. El polimorfismo implica que cada proteína del MHC se une a un motivo peptídico distinto. Sin embargo, en el caso de las proteínas de clase I, un individuo puede reconocer solamente seis tipos de motivos, mientras que la población humana entera puede llegar hasta 350 motivos. ¿Qué ventajas tiene este fenómeno para la población? ¿Y para el individuo?
4. ¿Cuáles son las contribuciones de cada CDR a los dominios variables de las Igs? ¿Qué relación tienen con los sitios de unión?
5. Los fenómenos de recombinación son importantes para generar la diversidad en el sitio de unión al antígeno de las Igs. Sin embargo, los fenómenos somáticos son procesos más importantes aun, en cuanto a la producción de diversidad de estas proteínas. ¿Está de acuerdo o no con esta afirmación? Explíquelo.
6. ¿Por qué tanto el TCR como las proteínas del MHC deben reconocer componentes del mismo antígeno? ¿Pueden reconocer los TCRs antígenos en ausencia de las proteínas del MHC?
7. Los genes del TCR disponen de una capacidad para producir diversidad en el repertorio de sitios de unión del antígeno, incluso mayor que los genes de las Igs. ¿Qué ventajas proporciona este fenómeno para el sistema inmunitario?
8. ¿Qué le pasaría al repertorio de linfocitos T en ausencia de selección positiva? ¿Y en el caso de ausencia de selección negativa?
9. ¿Cuál seria el resultado de la activación de todas las células T periféricas que interaccionan con antígeno? ¿Cómo ayuda a evitar esto el sistema de la segunda señal?
10. Pronostique cómo sería la respuesta inmunitaria debida a la señal 1 y 2 en ausencia de IL-1, IL-2 o IL-4. Haga la misma predicción pero en ausencia de receptores de IL-2 en las células T o de receptores de IL-4 en las células B.

La microbiología clínica se basa en la realización de un número de test y procedimientos para aislar e identificar los patógenos. Aquí mostramos el medio selectivo y diferencial *agar azul de eosina-metileno (EMB)*, que permite el crecimiento de un cierto número de bacterias (Gram negativas) y que también permite distinguir los organismos patógenos de los no patógenos aislados del tracto digestivo, urinario y otros sitios. La identificación microbiana no requiere siempre del aislamiento y el crecimiento del patógeno. Los métodos inmnunológicos y los de biología molecular pueden permitir realizar la identificación rápidamente y de forma segura, y esto permite que el tratamiento se realice antes.

24

MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA



I MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DEPENDIENTES DEL CULTIVO 797
24.1 Aislamiento de patógenos de muestras clínicas 797
24.2 Métodos de identificación dependientes de cultivo 803
24.3 Cultivos de prueba de sensibilidad antibiótica 807
24.4 Seguridad en el laboratorio clínico 809

II INMNUNOLOGÍA Y MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CLÍNICO 810
24.5 Inmunodiagnóstico para enfermedades infecciosas 810
24.6 Anticuerpos policlonales y monoclonales 812
24.7 Reacciones antígeno-anticuerpo *in vitro*: serología 816
24.8 Aglutinación 818
24.9 Microscopía inmunoelectrónica 820
24.10 Anticuerpos fluorescentes 820
24.11 Enzimoinmunoanálisis y radioinmunoanálisis 823
24.12 Técnicas de inmunotransferencia 828

III MÉTODOS MOLECULARES Y VISUALES EN EL DIAGNÓSTICO 830
24.13 Sondas de ácidos nucleicos 830
24.14 Virología diagnóstica 835

Glosario

Aglutinación reacción entre un anticuerpo y un antígeno unido a una partícula, que da lugar a un agregado de partículas visible

Antibiograma revisión de la sensibilidad de los antibióticos en uso de aislados clínicos

Anticuerpo fluorescente modificación covalente de una molécula de anticuerpo con un colorante fluorescente, de tal manera que el colorante hace visible el anticuerpo bajo la luz fluorescente

Anticuerpo monoclonal anticuerpo hecho por una sola célula B

Anticuerpo policlonal anticuerpo hecho por muchas células B

Bacteriemia presencia de bacterias en la sangre

Carga vírica número de genomas víricos en un tejido de paciente

Cultivo de enriquecimiento medio selectivo e incubaciones adecuadas para aislar microorganismos de muestras naturales

ELISA enzimoinmunoanálisis

Especificidad habilidad de un anticuerpo para reaccionar con un solo antígeno

Inmunotransferencia (western blotting) electroforesis de proteínas seguida de transferencia a una membrana y detección mediante adición de anticuerpos específicos

Medio diferencial medio que permite la identificación de microorganismos basados en su apariencia

Medio enriquecido medio que permite el crecimiento de microorganismos porque tiene añadidos factores de crecimiento

Medio para propósito general medio que soporta el crecimiento de la mayoría de aeróbicos y anaeróbicos falcultativos

Medio selectivo medio que permite el crecimiento de unos organismos retrasando el crecimiento de otros, debido a que tiene un componente añadido

Precipitación reacción entre un anticuerpo y un antígeno soluble que da lugar a un complejo visible e insoluble

RIA radioinmunoanálisis

Sensibilidad la más pequeña cantidad de antígeno que puede ser detectada

Septicemia infección de la sangre

Serología estudio de las reacciones antígeno-anticuerpo *in vitro*

Sonda de ácido nucleico en microbiología clínica, un oligonucleótido corto y de secuencia única que se emplea como sonda de hibridación para la identificación de patógenos (*véase* Capítulo 6 para su empleo generalizado)

Título en un contexto inmunológico, cantidad de anticuerpo presente en una solución

La actividad más importante del microbiólogo clínico es el aislamiento e identificación de agentes infecciosos. Esta área principal de la microbiología se denomina *microbiología clínica* o *diagnóstica*. Cada vez resulta más patente la transcendencia que tiene la identificación exacta del patógeno, que se hace en 48 horas. Recientes avances han permitido identificar los patógenos en minutos. Los métodos diagnósticos que se basan en procedimientos inmunológicos y de biología molecular permiten identificar muchos patógenos sin tener que recurrir a su cultivo; lo que resulta especialmente importante para el diagnóstico de infecciones por virus y protozoos, enfermedades que son difíciles de identificar dada la dificultad que existe para cultivar el agente.

I MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DEPENDIENTES DEL CULTIVO

Aquí discutiremos el aislamineto y cultivo del patógeno a partir del tejido. Los métodos dependientes del crecimiento son importantes para el diagnóstico clínico.

24.1 Aislamiento de patógenos de muestras clínicas

Tras un examen clínico del enfermo, el facultativo puede sospechar ya si se trata de una infección. Se recogen muestras de los tejidos o fluidos infectados para análisis microbiológico, inmunológico y de biología molecular (Figura 24.1). Según el tipo de infección, los materiales que deben recogerse incluyen sangre, orina, heces, esputo, líquido cefalorraquídeo o pus. Se puede pasar una torunda estéril por el área infectada (Figura 24.2), a continuación, con la torunda se hace una siembra en estrías sobre una placa de agar o se coloca directamente en un medio de cultivo líquido. En algunos casos, puede obtenerse asépticamente pequeñas muestras de tejido vivo (biopsia) para su posterior cultivo. La Tabla 24.1 resume las recomendaciones actuales relativas al cultivo de microorganismos aislados a partir de muestras clínicas características.

Para aislar organismos de importancia clínica y hacer un diagnóstico correcto, es necesario poner un especial cuidado a la hora de obtener muestras clínicas. El facultativo debe cerciorarse de que la muestra que se obtiene procede del *lugar auténtico de la infección*. Si el inóculo es insuficiente, no es posible la recuperación o la detección de los patógenos. Así mismo, con objeto de evitar la contaminación, se requiere que la muestra se tome en condiciones asépticas. Igualmente es necesaria una atención escrupulosa a fin de asegurar el mantenimiento de los requerimientos metabólicos de determinados organismos, como ocurre con el mantenimiento de las condiciones anoxigénicas (ausencia de oxígeno). Una vez que se ha obtenido la muestra, se analiza tan pronto como es posible.

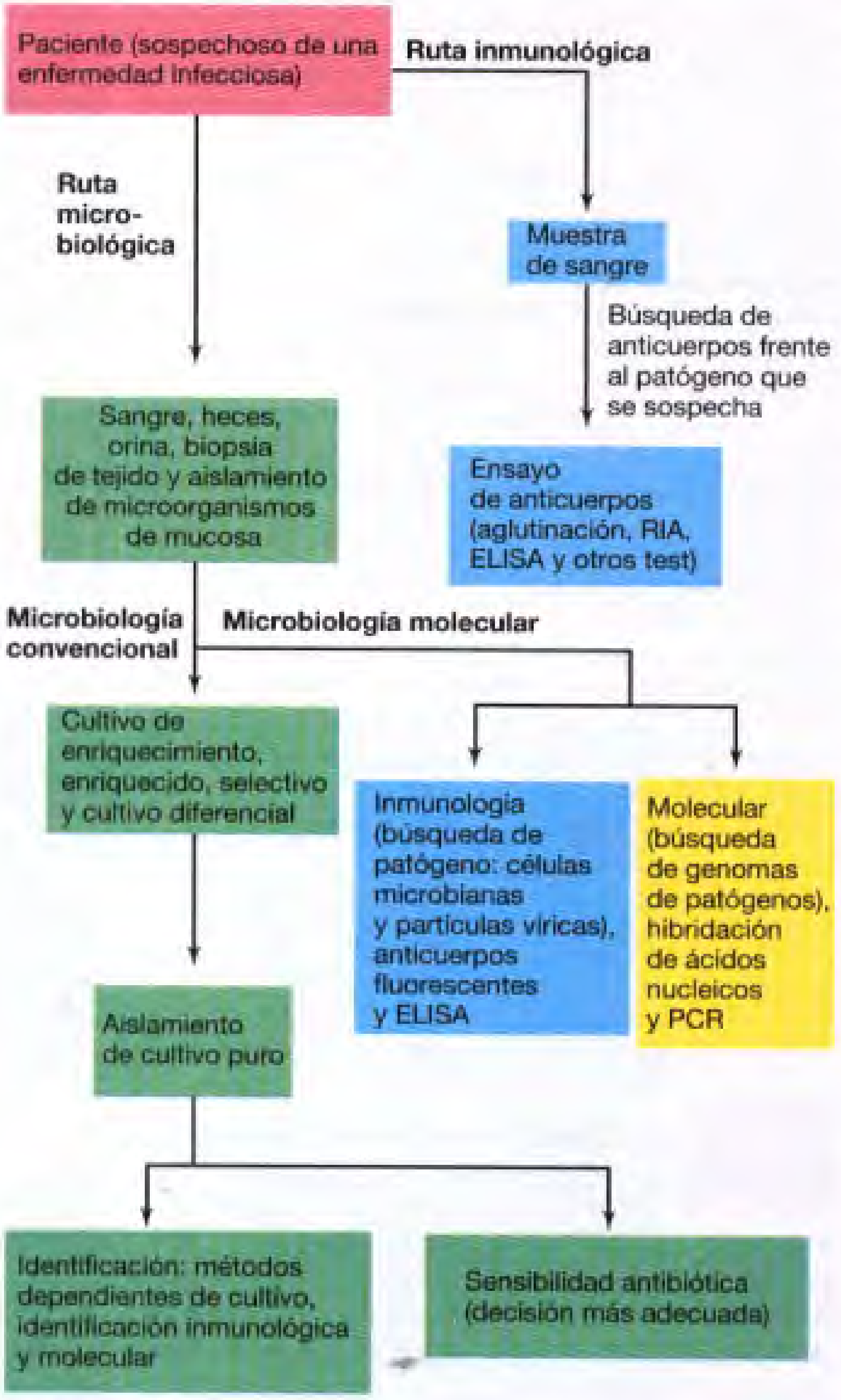

Paciente (sospechoso de una enfermedad infecciosa)
Ruta inmunológica
Ruta micro-biológica
Muestra de sangre
Búsqueda de anticuerpos frente al patógeno que se sospecha
Ensayo de anticuerpos (aglutinación, RIA, ELISA y otros test)
Sangre, heces, orina, biopsia de tejido y aislamiento de microorganismos de mucosa
Microbiología convencional
Microbiología molecular
Cultivo de enriquecimiento, enriquecido, selectivo y cultivo diferencial
Inmunología (búsqueda de patógeno: células microbianas y partículas víricas), anticuerpos fluorescentes y ELISA
Molecular (búsqueda de genomas de patógenos), hibridación de ácidos nucleicos y PCR
Aislamiento de cultivo puro
Identificación: métodos dependientes de cultivo, identificación inmunológica y molecular
Sensibilidad antibiótica (decisión más adecuada)

Figura 24.1 Métodos clínicos y diagnósticos usados en el aislamiento e identificación de patógenos.

Medio de cultivo y crecimiento

El **cultivo de enriquecimiento**, el uso de cultivos seleccionados y las condiciones de incubación, es una parte importante de la microbiología clínica. Los medios de cultivo en el laboratorio clínico son especiales. A través del uso de varios medios de cultivo los microorganismos de importancia médica pueden ser aislados, cultivados e identificados. La mayor parte de las muestras clínicas se cultivan primero en generales, como el agar sangre, que permiten el crecimiento de la mayoría de los organismos aerobios y anaerobios facultativos. El medio de enriquecimiento se utiliza para hacer crecer los microorganismos complicados, que requieren factores de crecimiento determinados, como *Neisseria gonorrhoeae*, el microorganismo que causa la gonorrea (Tabla 24.1). Ciertos medios son **medios selectivos**, que promueven el crecimiento de microorganismos mientras retrasan el crecimiento de otros, debido a que tienen componentes añadidos (Tabla 24.1). Finalmente, los **medios diferenciales** son los medios que permiten la identificación de los microorganismos por medio de su apariencia (*véase* Figura 24.7).

Cultivos de sangre

El término **bacteriemia** denota la presencia de bacterias en la sangre (Sección 21.7). En condiciones normales, la bacterias son eliminadas de la sangre rápidamente. Por tanto, la bacteriemia es infrecuente en individuos sanos y la presencia de bacterias en la sangre indica habitualmente infección generalizada. Los patógenos encontrados con más frecuencia en la sangre incluyen *Pseudomonas aeruginosa*, enterobacterias, especialmente *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, y los cocos Gram positivos *Staphilococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. La clásica infección de la sangre, la **septicemia**, es el resultado de la entrada en la sangre de un microorganismo a partir de un foco séptico, que se multiplica y se propaga a distintos tejidos del organismo para iniciar nuevas infecciones. Diversos síntomas graves generalizados son indicativos de septicemia, generalmente fiebre y escalofríos seguidos de postración. Los casos graves de septicemia pueden conducir al choque séptico, una condición sistémica que puede producir la muerte caracterizada por una intensa reducción de la presión sanguínea y fallos en múltiples órganos, como el corazón, los riñones o los pulmones. En muchas situaciones, el cultivo de sangre representa el único medio inmediato para aislar e identificar el

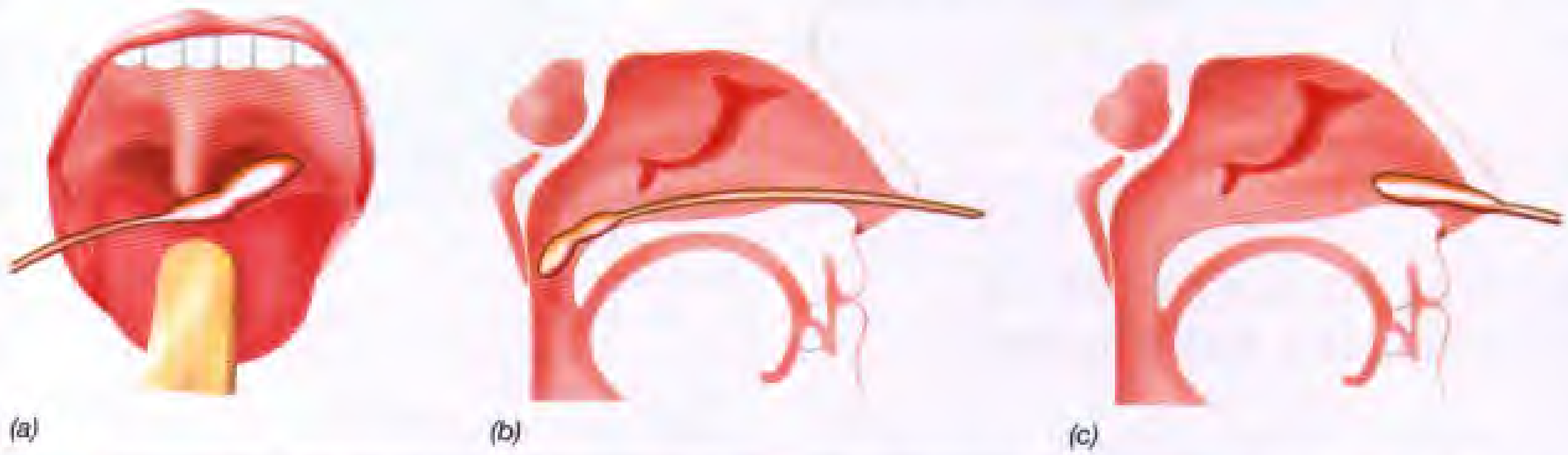


Figura 24.2 Métodos para la obtención de muestras del tracto respiratorio superior. (a) Torunda para la garganta. (b) Torunda nasofaríngea que se pasa a través de la nariz. (c) Torunda para el interior de la nariz.

TABLA 24.1 Medios enriquecidos recomendados para el aislamiento primario en un laboratorio de microbiología clínica[a]

	Medios[b]				
Muestra	**Agar sangre**	**Agar entérico**	**AC**	**TM**	**Agar anaeróbico**
Líquidos: pulmón, abdomen, pericardio	+	+	+	−	+
Heces: torundas rectales	+	+	+	−	−
Biopsias de tejido quirúrgico: pulmón, ganglios linfáticos	+	+	−	−	+
Garganta: torundas, esputo, amígdala, nasofaringe	+	+	+	−	−
Torundas genitourinarias: uretra, vagina, cérvix	+	+	+	+	−
Orina	+	+	−	−	−
Sangre	+	−	−	−	+
Torundas: heridas, abscesos, exudados	+	+	+	−	+

[a] Datos de P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover y R. H. Yolken. 1995. *Manual of Clinical Microbiology*, 6.ª edición. American Society for Microbiology, Washington, DC.

[b] Agar sangre, al 5% de sangre entera de oveja se le añade agar de soja tripticasa; agar entérico, ya sea agar eosina-azul de metileno (EMB) o agar MacConkey; AC, agar chocolate (sangre calentada); TM, agar Thayer-Martin; agar anaerobio, agar sangre con tioglicolato o agar suplementado con tioglicolato incubado en anaerobiosis.

agente etiológico, por lo que el diagnóstico dependerá de un cuidadoso y correcto cultivo sanguíneo.

La técnica estándar del cultivo de sangre consiste en obtener asépticamente 10 ml de sangre de una vena e inocularla en un frasco de cultivo de sangre que contiene un anticoagulante y un medio de cultivo rico, que permite el crecimiento de la mayoría de los microorganismos. Se establecen dos cultivos, uno en un frasco que se incuba en condiciones aerobias y otro en condiciones anaerobias. Todos los medios utilizados son relativamente ricos, contienen digeridos de proteínas y otros ingredientes complejos. Los frascos de cultivo de sangre se incuban a 35°C y se examinan a diario durante 5 días. La mayor parte de las bacterias de interés clínico se observan en este periodo. Algunos sistemas de aislamiento con sangre recurren a sustancias químicas que lisan eritrocitos y leucocitos, liberando los patógenos intracelulares que de otro modo podrían pasar inadvertidos. En los cultivos de sangre, los microorganismos se detectan habitualmente mediante inspección visual (turbidez), examen microscópico y subcultivo. Los sistemas de cultivo sanguíneo automatizados detectan el crecimiento a través de la monitorización continua de la producción de dióxido de carbono y la turbidez, que se leen cada 10 minutos.

Teniendo en cuenta que es inevitable que una determinada zona de la piel se contamine durante la extracción inicial de sangre, puede esperarse un índice de contaminación del 2% al 3%. La presencia de organismos aislados habitualmente de la piel, tales como *Staphylococcus epidermidis*, bacterias corineiformes o propionibacterias, puede indicar contaminación, aunque a veces estos organismos pueden incluso ser causa de infección de la pared del corazón (endocarditis bacteriana subaguda). Por tanto, se necesita una considerable experiencia microbiológica y clínica a la hora de interpretar los cultivos de sangre.

Cultivos de orina

Las infecciones del tracto urinario son muy frecuentes y, a menudo, los agentes etiológicos son idénticos o parecidos a las bacterias que constituyen la flora normal (por ejemplo, *Escherichia coli*). Por esta razón han de extremarse las precauciones en el momento de realizar un análisis bacteriológico de la orina, dado que la orina favorece el crecimiento bacteriano masivamente bajo diversas condiciones. Un recuento bastante alto de células en la muestra indica infección urinaria. En la mayoría de los casos, la infección es el resultado de la ascensión de un organismo por la uretra procedente del exterior. Ocasionalmente puede llegar a infectarse incluso la vejiga. Las infecciones del tracto urinario inferior suponen la forma más común de infección *nosocomial* (adquirida en el hospital) (Sección 25.7).

Una infección urinaria importante suele dar recuentos de 10^5 o más organismos por mililitro de una muestra de orina recogida a mitad de micción, mientras que en ausencia de infección, la contaminación de la orina a partir de los genitales externos (prácticamente inevitable hasta cierto punto) da lugar a recuentos inferiores a 10^3 organismos por mililitro. Los patógenos más comunes del tracto urinario son miembros de las enterobacterias, siendo *E. coli* la responsable de aproximadamente el 90% de los casos. Otros patógenos del tracto urinario incluyen *Klebsiella, Enterobacter, Proteus, Pseudomonas, Sthaphylococcus saprophyticus* y *Enterococcus faecalis*. *Neisseria gonorrhoeae*, el agente etiológico de la gonorrea, no crece en la orina sino en el epitelio uretral y debe diagnosticarse por métodos diferentes (*véase* más adelante).

Se puede utilizar el examen microscópico directo de la orina para indicar la existencia de *bacteriuria*, es decir, la presencia de un número anormalmente elevado de bacterias en la orina. Sin embargo, puesto que casi todas las orinas contienen un cierto número de bacterias, lo más frecuente es que una bacteriuria significativa se monitorice usando distintas pruebas mediante tiras de papel indicador, de las que existen varios tipos disponibles en el comercio. Por ejemplo, una prueba con una tira de papel indicador monitoriza la reducción del nitrato detectando la reducción de su producto, el nitrito. Una prueba se considera positiva cuando se produce un cambio de color en la tira de papel indicador (Figura 24.3). Hay que tener en cuenta que la producción de nitrito ocurre sólo cuando existen más de 10^5 enterobacterias por mililitro, por lo que el método permite comprobar casi instantáneamente la existencia de una infección del tracto urinario. Hay otras pruebas que utilizan tiras de papel indicador en infecciones del tracto urinario, que habitualmente se asocian a la reducción del nitrato, y que detectan la esterasa (producida por leucocitos) (Sección

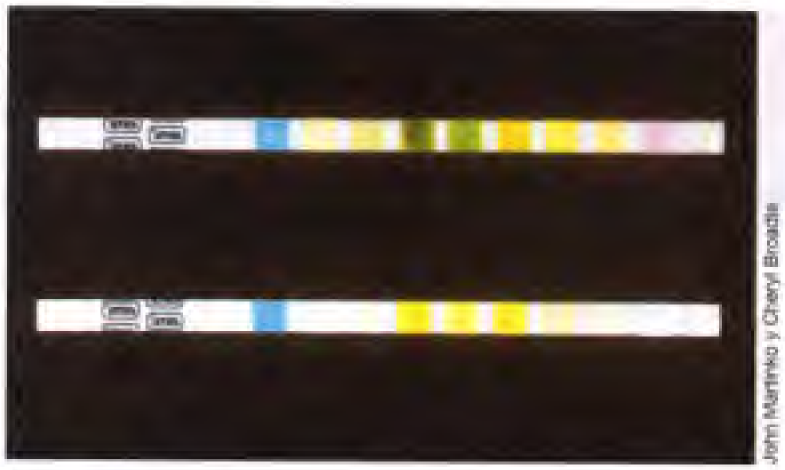

John Martinko y Cheryl Broadie

Figura 24.3 Tiras para el análisis de orina. Debajo de la tira de prueba se observa una tira de control. De izquierda a derecha, en una muestra de orina la tira mide los niveles anormales de glucosa, bilirrubina, cetonas, gravedad específica, sangre, pH, proteínas, urobilinógeno, nitritos y leucocitos (esterasa). Lecturas anormales de esterasa (señal positiva, rojo a distancia) y nitritos (positivo intenso, el segundo a partir de la derecha) indican bacteriuria. El cultivo posterior de esta muestra demostró la presencia de *Escherichia coli*.

22.1) y la peroxidasa (producida por algunas bacterias) (Secciones 6.13 y 17.22). Después de una prueba con tira de papel indicador positiva se realiza un cultivo de orina.

Para cultivar posibles patógenos del tracto urinario se utilizan dos medios: (1) agar sangre como un medio general no selectivo; y (2) un medio selectivo para enterobacterias como agar MacConkey o agar eosina-azul de metileno (EMB) (*véase* Sección 24.2 y Figura 24.4). Estos medios especializados permiten una primera diferenciación entre fermentadores de lactosa y no fermentadores, e inhibe el crecimiento de organismos Gram positivos como *Staphylococcus* spp. (contaminantes habituales de la piel). Una vez aislados los organismos, pueden identificarse y realizarse pruebas de sensibilidad antibiótica. Los microbiólogos clínicos experimentados suelen hacer una identificación presuntiva a partir de un aislado, observando el color y la morfología de las colonias del patógeno sospechoso que ha crecido en distintos medios selectivos como los descritos en la Tabla 24.2. Dicha identificación debe completarse con análisis más detallados, si bien los microbiólogos clínicos utilizan esta información conjuntamente con los resultados de pruebas más precisas, de las que se hablará a lo largo del resto de este capítulo, con el fin de lograr una identificación adecuada.

Por último, si no se obtiene crecimiento bacteriano, a pesar de la persistencia de los síntomas de la infección del tracto urinario, entonces el clínico puede solicitar cultivos directos específicos con objeto de identificar patógenos más exigentes como *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Branhamella* spp., micoplasma u otros organismos anaerobios.

Cultivos de heces

El aislamiento de patógenos intestinales conlleva la adecuada recogida y preservación de las heces. Durante el almacenamiento disminuye el pH de las heces, de ahí que deba evitarse una demora prolongada entre la recogida de la muestra y su procesamiento. Este aspecto es especialemnte crítico en el caso del aislamiento de especies de los géneros *Shigella* y *Salmonella*, que son bastante sensibles al pH ácido. Las muestras recogidas a partir de heces recientes se vacían sobre un recipiente de plástico estéril y se colocan en un vial que contiene un tampón fosfato para el transporte al laboratorio. Si las heces del enfermo son sanguinolentas o contienen pus, siempre debe obtenerse muestras de este material; estas deposiciones contienen generalmente un gran número de organismos de interés clínico. En el caso de que se sospeche infecciones transmitidas por alimentos o a través del agua, las muestras fecales deben inocularse en distintos medios selectivos (*véase* Sección 24.2) para el aislameinto de bacterias específicas. La caracterización de parásitos intestinales se realiza bajo el microscopio, los métodos de cultivo se desaconsejan (Sección 28.7).

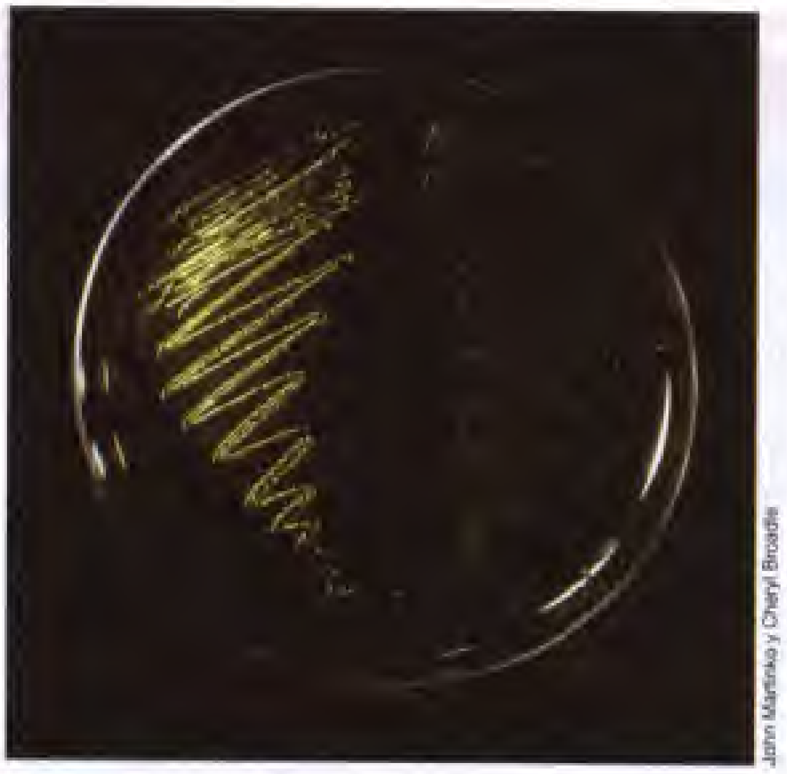

John Martinko y Cheryl Broadie

Figura 24.4 Placa de agar eosina-azul de metileno (EMB) mostrando un fermentador de lactosa, *Escherichia coli* (izquierda) y un no fermentador de lactosa, *Pseudomonas aeruginosa* (derecha). Obsérvese el brillo verde metálico de las colonias de *E. coli*.

Heridas y abscesos

Cuando se trata de infecciones asociadas a heridas traumáticas como mordeduras de animales o del hombre, quemaduras, cortes o penetración de objetos extraños, las muestras han de recogerse con especial cuidado para recuperar el patógeno de interés. Es necesario tener en cuenta que generalmente las infecciones de heridas y abscesos están contaminadas con miembros de la microbiota normal. La obtención de muestras mediante torunda suele ser inadecuada. El mejor método para obtener una muestra es la aspiración, a partir de lesiones purulentas (que contienen pus), con una jeringa y una aguja estériles, seguida de la desinfección de la superficie cutánea con etanol o isopropanol al 70%. Las muestras de flujos internos purulentos se recogen habitualmente por biopsia o mediante resección quirúrgica de los tejidos.

Existe una serie de patógenos que se asocia con infecciones de heridas. Como algunos de estos patógenos son anaerobios, el transporte de las muestras desde el lugar donde se han recogido debe hacerse en estricta anaerobiosis. Un patógeno que se asocia con frecuencia a secreciones

TABLA 24.2 Características de las colonias de los bacilos Gram negativos que se aíslan con frecuencia cultivándolos en distintos medios de utilidad clínica[a]

	Medios de agar[b]			
Organismo	**EMB**	**MC**	**SS**	**BS**
Escherichia coli	Centro oscuro con brillo metálico grisáceo (*véase* Figura 24.4)	Rojas o rosas	Rojas o rosadas	La mayoría inhibidas
Enterobacter	Similar a *E. coli*, pero las colonias son más grandes	Rojas o rosas	Blancas o beige	Colonias mucoides con brillo argéntico
Klebsiella	Grandes, mucoides y marronáceas	Rosas	Rojas o rosadas	La mayoría inhibidas
Proteus	Translúcidas, incoloras	Transparentes, incoloras	Centro negro, periferia clara	Verde
Pseudomonas	Translúcidas, incoloras al oro (*véase* Figura 24.4)	Transparentes, incoloras	La mayoría inhibidas	Sin crecimiento
Salmonella	Translúcidas, incoloras al oro	Transparentes, incoloras	Opacas	Negras a verde oscuras
Shigella	Translúcidas, incoloras al oro	Transparentes, incoloras	Opacas	Marrones o inhibidas

[a] Adaptado de P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover y R. H. Yolken. 1999. *Manual of Clinical Microbiology*, 7.ª edición. American Society for Microbiology, Washington, DC.

[b] BS, agar bismuto sulfito; EMB, agar eosina-azul de metileno; MC, agar MacConkey; SS, agar *Salmonella-Shigella*.

purulentas es el *Staphylococcus aureus*, aunque también son habituales las enterobacterias *Pseudomonas aeruginosa*, y las especies de los anaerobios *Bacteroides* y *Clostridium*. Los principales medios de aislamiento son el agar sangre, distintos medios selectivos para enterobacterias (Tablas 24.1 y 24.2), y el agar sangre con suplementos adicionales y agentes reductores para anaerobios obligados. Los frotis que se preparan a partir de dichas muestras también deberían examinarse directamente en el microscopio.

Muestras genitales y diagnóstico de laboratorio de la gonorrea

En los varones, el síntoma clásico de la gonorrea, una enfermedad de transmisión sexual, es una descarga purulenta por la uretra (Sección 26.12). Si no existe esta descarga, puede obtenerse una muestra adecuada mediante una torunda de algodón estéril, de diámetro estrecho, que se inserta en el interior de la uretra, se deja colocada durante unos segundos para absorber cualquier exudado y, a continuación, se extrae para cultivar *Neisseria gonorrhoeae*, el agente etiológico de la gonorrea. Una posibilidad alternativa es recoger una muestra de la primera orina de la mañana, de un individuo infectado, que contiene generalmente células viables de *N. gonorrhoeae*. En las mujeres en las que se sospeche gonorrea u otras infecciones genitales, las muestras se obtienen habitualmente mediante una torunda a partir del cérvix y la uretra.

La gonorrea representa una de las infecciones más frecuentes en los adultos y las técnicas microbiológicas clínicas son fundamentales para su diagnóstico. *N. gonorrhoeae* (a la que clínicamente se la conoce como *gonococo*) coloniza las superficies mucosas de la uretra, el cérvix uterino, el canal anal, la garganta y la conjuntiva. Se trata de un organismo bastante sensible a la desecación y de ahí que su transmisión sea casi exclusivamente por contacto directo de persona a persona, generalmente mediante el coito. El objetivo primario que persiguen las medidas sanitarias para el control de la gonorrea implica la identificación de los portadores asintomáticos, lo que supone la realización de análisis microbiológicos.

El gonococo es un coco Gram negativo y habitualmente se observa en forma de diplococo; como existen organismos parecidos que no son muy frecuentes en la microbiota normal del tracto urogenital, tiene un valor diagnóstico realizar una observación directa en el microscopio de material teñido con el Gram. Por ejemplo, la observación de diplococos Gram negativos en una descarga uretral o sobre un frotis vaginal o cervical, es un diagnóstico presuntivo de gonorrea. En la gonorrea aguda, el microscopio revela generalmente la presencia de diplococos Gram negativos fagocitados por leucocitos polimorfonucleares (Sección 20.1), sin que existan virtualmente otros organismos acompañantes (Figura 24. 5*a*).

Las técnicas de cultivo poseen un mayor grado de sensibilidad respecto a los análisis microscópicos. La mayoría de los medios para el cultivo de *N. gonorrhoeae* contienen sangre o hemoglobina calentadas (conocidos como medio de *agar chocolate* debido a su apariencia marrón oscura), siendo el calentamiento la causa de la formación de un material precipitado que es bastante eficaz para absorber productos tóxicos presentes en el agar y en otros constituyentes del medio. Otro medio importante para un aislamiento primario, denominado agar Thayer-Martin, también se utiliza para el aislamiento de *N. gonorrhoeae* (Figura 24.5). Este medio incorpora los antibióticos vancomicina, nistatina y colistina, a los que la mayoría de los aislados clínicos de *N. gonorrhoeae* son resistentes por naturaleza; también permite el aislamiento de *N. meningitides*, que causa la meningitis bacteriana.

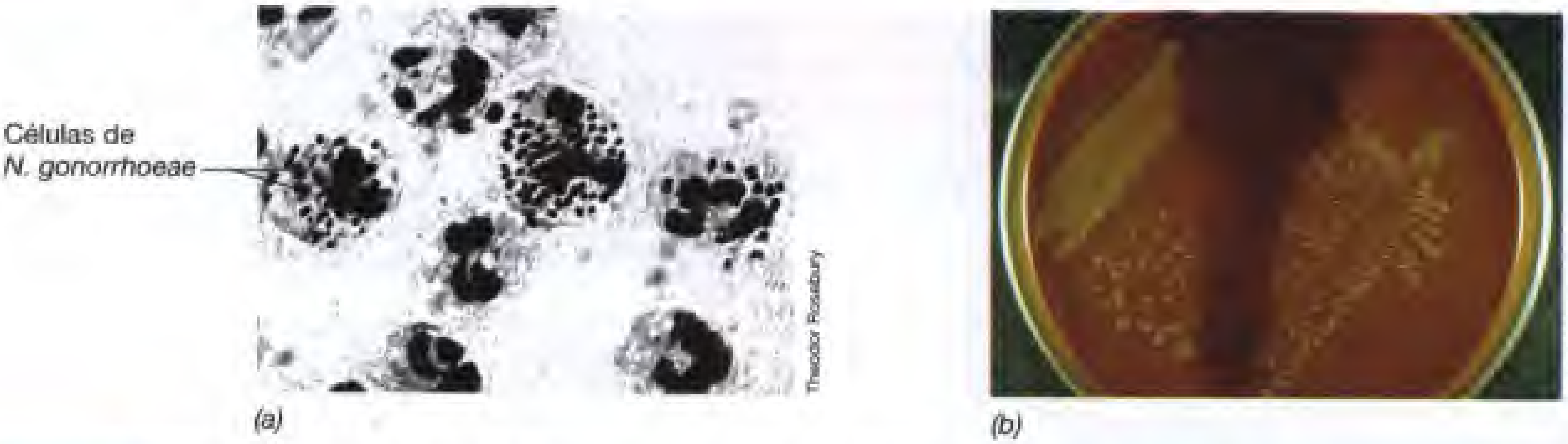


Figura 24.5 (a) Micrografía de *Neisseria gonorrhoeae* en el interior de leucocitos polimorfonucleares humanos a partir de un frotis cervical. Obsérvense multitud de diplococos dispuestos en parejas (flechas). (b) Colonias de *N. gonorrhoeae* creciendo en agar Thayer-Martin. Se ha teñido la placa en la parte central con un reactivo que tiñe de azul las colonias cuando las células contienen citocromo c (prueba de la oxidasa). *N. gonorrhoeae* es oxidasa positivo.

Después de la siembra por estrías, las placas deben incubarse en un ambiente húmedo, en una atmósfera que contenga 3 a 7% de CO_2 (el CO_2 se necesita para el crecimiento de los gonococos). Las placas se examinan después de 24 y 48 horas, e inmediatamente deben analizarse porciones de las colonias mediante la prueba de la oxidasa, ya que todas las *Neisseria* son oxidasa-positivas (Figura 24.5*b*, *véase* Sección 24.2). Si el inóculo es de origen urogenital, los diplococos Gram negativos oxidasa-positivos que crecen en agar chocolate son gonococos casi con toda seguridad. Sin embargo, la identificación definitiva implica la determinación de los patrones de utilización de hidratos de carbono, o pruebas inmunológicas, o el uso de sondas de ácidos nucleicos (*véase* Secciones 24.5-24.14).

Cultivos de anaerobios

Las bacterias anaerobias estrictas son causa frecuente de infección y pasan desapercibidas totalmente, a menos que se tomen las debidas precauciones para su aislamiento y cultivo. En la Sección 6.13 se han expuesto las generalidades sobre los anaerobios, observando que muchos anaerobios son muy susceptibles al oxígeno. Todo ello justifica que se necesite una atención especial en la recogida de muestras, su manejo y procesamiento, por si pudiera tratarse de un anaerobio. En el organismo existen distintos hábitat (por ejemplo, la cavidad oral y el tracto intestinal) (Secciones 21.3 y 21.4) que son habitualmente anóxicos y en ellos puede encontrarse bacterias anaerobias estrictas formando parte de la microbiota. Sin embargo, otras partes del organismo pueden llegar a ser anóxicas como resultado de una herida o un traumatismo, reduciendo el aporte sanguíneo en el lugar de la herida. Estos lugares anaerobios se encuentran disponibles para ser colonizados por anaerobios estrictos. En general, las bacterias anaerobias patógenas forman parte de la microbiota y son únicamente patógenos oportunistas. Existen, sin embargo, dos patógenos anaerobios importantes, *Clostridium tetani* (que produce el tétanos) y *C. perfringens* (causante de la gangrena gaseosa y un tipo de toxiinfección alimentaria), que son bacterias formadoras de esporas y predominan en el suelo.

Gracias al cultivo anaerobio, el microbiólogo se enfrenta no sólo con los problemas habituales de obtener y conservar la muestra libre de contaminación, sino que también tiene que asegurarse que la muestra no entre en contacto con el aire. Las muestras recogidas mediante succión o biopsia deben colocarse inmediatamente en un tubo con un gas libre de oxígeno, preferentemente conteniendo una pequeña cantidad de una solución diluida de sales con un agente reductor como el tioglicolato y el indicador redox *resazurina*. Este colorante es incoloro cuando está reducido y vira a color rosa cuando se oxida, indicando así rápidamente cualquier contaminación con oxígeno de la muestra. Si no se dispone de un tubo de transporte anaerobio adecuado, puede utilizarse la misma jeringa para transportar la muestra, insertándose la aguja en un tapón de caucho estéril para que de este modo no penetre aire en la jeringa.

Cuando se precisa de una incubación en anaerobiosis, las placas de agar se colocan en una jarra sellada que se hace anóxica reemplazando la atmósfera de la jarra con una mezcla de gas libre de oxígeno (habitualmente se emplea una mezcla de N_2 y CO_2) o añadiendo algún compuesto que elimine el oxígeno de la atmósfera de la jarra cerrada. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 24.6, se genera H_2 y en

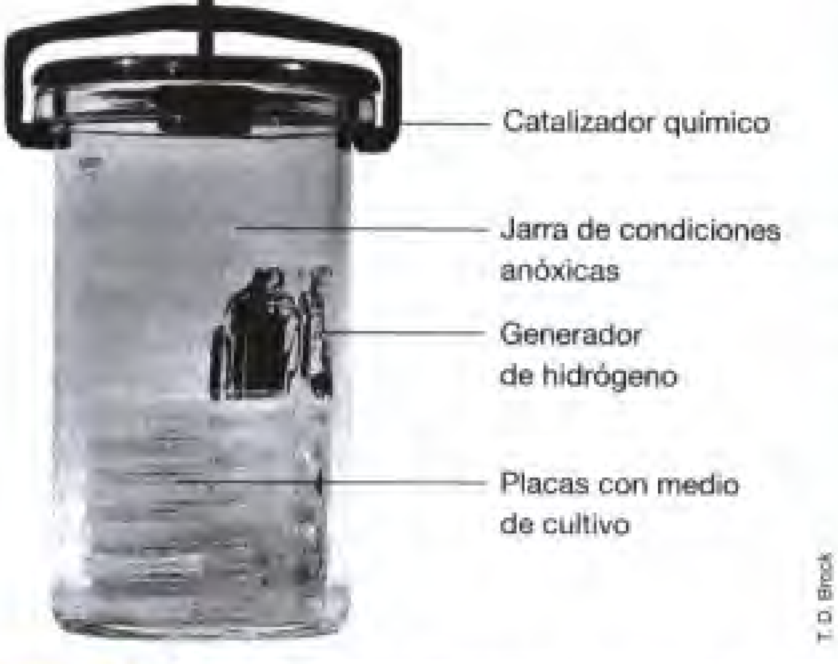


Figura 24.6 Jarra sellada que permite la incubación de los cultivos en condiciones anoxigénicas. El catalizador y el generador de hidrógeno mantienen la jarra en condicciones anóxicas.

presencia de un catalizador adecuado, generalmente paladio, el H_2 se combina con el oxígeno libre para formar H_2O, eliminándose de esta forma el oxígeno contaminante. Existen otros medios alternativos para lograr condiciones anaerobias, como son el uso de medios de cultivo que contengan agentes reductores y la utilización de cámaras de anaerobiosis (*glove boxes*). Estas últimas son bolsas grandes impermeables al gas llenas de un gas libre de oxígeno, como nitrógeno o hidrógeno, y que se ajustan mediante una cámara de aire para añadir y extraer los cultivos (Figura 6.26*b*). La ventaja que presenta una cámara de anaerobiosis es que puede hacerse manipulaciones como normalmente se hacen sobre una poyata de laboratorio; sin embargo, este sistema no se emplea profusamente en los laboratorios de investigación debido a su coste elevado, aunque está siendo cada vez más utilizado en laboratorios de investigación especializados en microorganismos anaeróbicos.

Los medios para anaerobios, por lo general, no se distinguen mucho de los usados para los aerobios, salvo que son mucho más ricos en elementos orgánicos y contienen agentes reductores (generalmente cisteína o tioglicolato) y un indicador reductor como resazurina.

✓ 24.1 Revisión de conceptos

El método adecuado de tomar la muestra y el cultivo del patógeno es el principal problema para la identificación del organismo que causa la enfermedad. La selección de la apropiada toma de la muestra y las condiciones de cultivo requieren conocimientos de ecología bacteriana, fisiología y nutrición.

- ✓ ¿Por qué los cultivos de orina son casi siempre positivos para el crecimiento bacteriano?
- ✓ Describa las precauciones que se deben tener en cuenta para el éxito en el aislamiento de anareobios patógenos.

24.2 Métodos de identificación dependientes del cultivo

Si la inoculación de un medio primario da lugar al crecimiento bacteriano, el microbiólogo clínico debe identificar el organismo u organismos presentes. Habitualmente, la identificación de un aislado clínico se puede hacer recurriendo a distintas pruebas dependientes del crecimiento. A continuación, vamos a exponer algunos de estos métodos.

Crecimiento en medios selectivos y diferenciados

Tomando como punto de partida las características de crecimiento en medios de aislamiento primario, un microbiólogo clínico realiza subcultivos de un patógeno desconocido en varias docenas de medios de cultivo útiles para el diagnóstico. La Tabla 24.3 resume los principales métodos de indentificación. Gran parte de estos medios se presentan en forma de kits miniaturizados que contienen distintos medios en pocillos separados y que se han inoculado a la vez (Figura 24.7).

La batería de medios incluye medios selectivos, diferenciales o ambos al mismo tiempo. Un *medio selectivo* es aquél en el que los compuestos han sido añadidos selectivamente para inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos y no de otros. Un *medio diferencial* es aquél en el que se ha añadido una clase de indicador, generalmente un colorante, que permite al clínico diferenciar entre distintas reacciones químicas que se producen durante el crecimiento. Por ejemplo, el agar eosina-azul de metileno (EMB) se utiliza como un medio selectivo *y* diferencial. El agar EMB se utiliza para el aislamiento de enterobacterias Gram negativas. La presencia del azul de metileno inhibe las bacterias Gram positivas; aunque se desconoce su mecanismo de acción, se sabe que pequeñas cantidades de este colorante inhiben eficazmente el crecimiento de la mayor parte de las bacterias Gram positivas. La eosina es un colorante que responde a los cambios del pH, virando del incoloro al negro en condiciones de acidez. El medio agar EMB contiene lactosa y sacarosa, pero no glucosa, como fuentes de energía. Las bacterias fermentadoras de lactosa (generalmente entéricas), como *Escherichia coli*, *Klebsiella* y *Enterobacter*, acidifican el medio y las colonias se muestran de color negro con un brillo verdoso. Las colonias de los no fermentadores de lactosa como *Salmonella*, *Shigella* y *Pseudomonas* son translúcidas o rosadas (Figura 24.4). Esto es, EMB *selecciona* preferentemente para el aislamiento de bacterias Gram negativas y *diferencia* entre varios géneros de bacterias Gram negativas.

Estas pruebas miden la presencia o ausencia de *enzimas* que participan en el catabolismo del sustrato o sustratos que se añaden al medio diferencial. La fermentación de los azúcares se mide incorporando indicadores de pH que cambian de color en medio ácido (Figura 24.7*a*). La producción de gas hidrógeno y/o dióxido de carbono durante la fermentación del azúcar se analiza observando la producción de gas en viales de recogida de gases o en agar (Figura 24.7*a* y *b*). La producción de sulfuro de hidrógeno puede revelarse en un medio con hierro férrico. Si se genera sulfuro, el hierro férrico se acompleja con el H_2S para formar un precipitado negro de sulfuro de hierro (Figura 24.7*b*). La utilización de ácido cítrico, un ácido de seis carbonos que contiene tres grupos ácidos carboxílicos, se acompaña de una elevación del pH, de tal manera que la adición al medio de prueba de un colorante específico vira el color cuando se dan condiciones alcalinas (Figura 24.7*c*). Se han desarrollado cientos de pruebas diferentes para uso clínico pero solamente se utilizan rutinariamente unas veinte (Figura 24.7*d*).

Se han publicado los patrones de reacción típicos para un gran número de cepas de distintos patógenos y en el moderno laboratorio de microbiología clínica toda esta información se almacena en un ordenador. Los resultados de estas pruebas diferenciales para un patógeno desconocido se archivan en el ordenador y un programa especial permite decidir, con los resultados obtenidos, el agente etiológico de que se trate. Para la mayoría de los microorganismos, se necesitan tan sólo tres o cuatro pruebas para hacer una identificación inequívoca. Cuando a pesar de ello existen dudas de identificación, puede recurrirse a técnicas de identificación más sofisticadas, sobre todo cuando varios patógenos con características de crecimiento similares, presentan regímenes de quimioterapia distintos.

Diagnóstico clínico

Muchas compañías comercializan sus propios sistemas para la identificación rápida (Figura 21.7*d*). A menudo, dichos sistemas están diseñados para ser usados en la identifica-

TABLA 24.3 Pruebas importantes para el diagnóstico clínico de bacterias

Prueba	Principio	Método	Utilización más frecuente
Fermentación de hidratos de carbono	Producción de ácido y/o gas durante el crecimiento fermentativo con azúcares o alcoholes azucarados	Un caldo de cultivo con hidratos de carbono y rojo fenol como indicador de pH; tubo invertido para el gas	Diferenciación de enterobacterias
Catalasa	La enzima descompone el peróxido de hidrógeno, H_2O_2	Añadir una gota de H_2O_2 a un cultivo denso y buscar burbujas (O_2) (Figura 6.29)	*Bacillus* (+) de *Clostridium* (−); *Streptococcus* (−) de *Micrococcus-Staphylococcus* (+)
Utilización del citrato	La utilización del citrato como única fuente de carbono produce la alcalinización del medio	Un medio de citrato con azul de bromotimol como indicador de pH. Buscar un color azul intenso (pH alcalino)	*Klebsiella-Enterobacter* (+) de *Escherichia*(−), *Edwardsiella* (−) de *Salmonella* (+) (Figura 24.7)
Coagulasa	La enzima provoca la aglutinación del plasma sanguíneo	Mezclar una suspensión líquida densa de bacterias con plasma, incubar y buscar un coágulo de fibrina	*Staphylococcus aureus* (+) *S. epidermidis* (−)
Decarboxilasas (lisina, ornitina, arginina)	La decarboxilación de los aminoácidos libera CO_2 y amina	Medio enriquecido con aminoácidos. El púrpura de bromocresol como indicador de pH vira a púrpura (pH alcalino) si actúa la enzima	Ayuda en la determinación del grupo bacteriano entre las enterobacterias
Prueba de la β-Galactosidasa (ONPG)	El ortonitrofenil-β-galactósido (ONPG) es un sustrato artificial para la enzima. Cuando se hidroliza, se forma el nitrofenol (amarillo)	Incubar una suspensión pesada de un cultivo lisado con ONPG. Buscar un color amarillo	*Citrobacter* y *Arizona* (+) *Salmonella* (−). Identificación de algunas especies de *Shigella* y *Pseudomonas*
Licuefacción de la gelatina	Muchas hidrolasas hidrolizan la gelatina y destruyen el gel	Incubar un caldo con 12% de gelatina. Enfriar para comprobar la formación del gel. Si se hidroliza la gelatina, el tubo permanece líquido cuando se refrigera	Ayudar en la identificación de *Serratia, Pseudomonas, Flavobacterium, Clostridium*
Producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S)	La producción de H_2S por rotura de los aminoácidos azufrados o reducción del tiosulfato	El H_2S se detecta en un medio rico en hierro a partir de la formación de sulfito ferroso negro (muchas variantes: agar hierro de Kligler y agar hierro triple azúcar también detectan la fermentación de hidratos de carbono)	En enterobacterias, ayudar en la identificación de *Salmonella, Arizona, Edwardsiella* y *Proteus* (Figura 24.7)
Prueba del indol	Conversión del triptófano de las proteínas en indol	Detección de indol en el medio de cultivo con dimetil-aminobenzaldehído (color rojo)	Distinguir *Escherichia* (+) de *Klebsiella* (−) y *Enterobacter* (−); *Edwardsiella* (+) de *Salmonella* (−)
Prueba del rojo de metilo	Los fermentadores mixtos de ácidos producen suficiente ácido para disminuir el pH por debajo de 4,3	Caldo de glucosa. Después de la incubación, añadir indicador rojo de metilo a la muestra	Diferenciar *Escherichia* (+ , cultivo rojo) de *Enterobacter* y *Klebsiella* (generalmente −, cultivo amarillo)

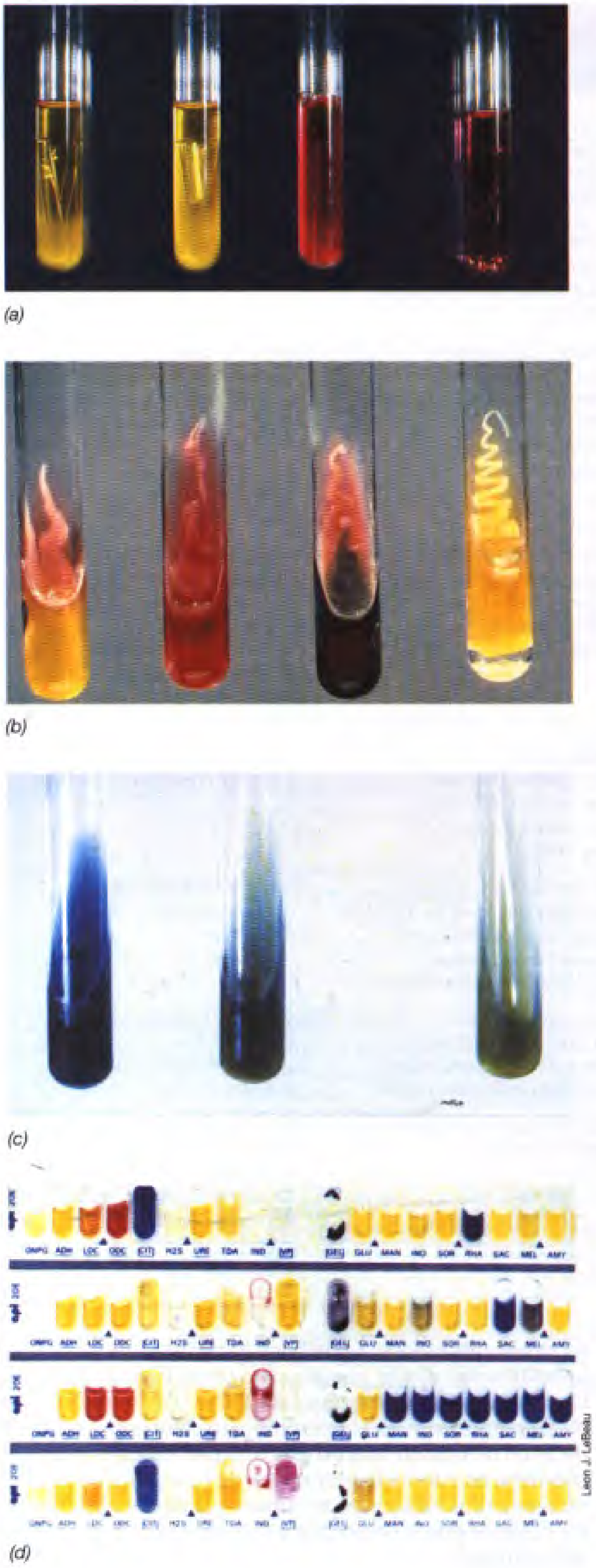
TABLA 24.3 Pruebas importantes para el diagnóstico clínico de bacterias *(continuación)*

Prueba	Principio	Método	Utilización más frecuente
Reducción del nitrato	El nitrato como un aceptor electrónico alternativo, reducido a NO_2^- o N_2	Caldo con nitrato. Tras la incubación, detectar nitrito con ácido α-naftilamina sulfanílico (color rojo). Si es negativo, confirmar que el NO_3^- está aún presente añadiendo polvo de zinc para reducir el NO_3^- a NO_2^-. Si tras la adición del zinc no hay color, entonces $NO_3^- \rightarrow N_2$	Ayudar en la identificación de enterobacterias (generalmente +)
Prueba de la oxidasa	El citocromo *c* oxida el aceptor de electrones artificial: tetrametil (o dimetil)-*p*-fenilendiamina	Caldo o agar. Las colonias oxidasa positivas en agar pueden detectarse sumergiendo la placa en un reactivo, y buscando colonias azuladas o marrones	Separar *Neisseria* y *Moraxella* (+) de *Acinetobacter* (−). Separar enterobacterias (todas −) de psudomonas (+). Ayudar en la identificación de *Aeromonas* (+)
Prueba de la oxidación-fermentación (O/F)	Algunos organismos producen ácido solamente cuando crecen en aerobiosis	Producción de ácido en la parte alta del tubo de cultivo que contiene azúcar; el agar blando se utiliza para disminuir la mezcla durante la incubación	Diferenciar *Micrococcus* (producción de ácido solamente en aerobiosis) de *Staphylococcus* (producción anaeróbica de ácido). Caracterizar *Pseudomonas* (producción aeróbica de ácido) de enterobacterias (producción anaeróbica de ácido)
Prueba de la fenilalanín-desaminasa	La desaminación produce ácido fenilpirúvico que se detecta en una prueba colorimétrica	Medio enriquecido en fenilalanina. Después del crecimiento, añadir cloruro férrico y buscar el color verde	Caracterizar el género *Proteus* y el grupo *Providencia*
Hidrólisis del almidón	El iodo-ioduro da un color azul con el almidón	Crecimiento de un organismo en una placa que contiene almidón. Sumergir la placa en ioduro de Gram y buscar zonas claras alrededor de las colonias	Identificar los hidrolizadores típicos de almidón, como *Bacillus* spp.
Prueba de la ureasa	La urea $H_2N—CO—NH_2$ se escinde en $2\,NH_3 + CO_2$	Medio con un 2% de urea y rojo fenol como indicador. La liberación de amonio eleva el pH, intenso color rojo rosado	Distinguir *Klebsiella* (+) de *Escherichia* (−). Distinguir *Proteus* (+) de *Providencia* (−)
Prueba del Voges-Proskauer	La acetoína es producida a partir de la fermentación de azúcares	Prueba química para acetoína utilizando α-naftol	Distinguir *Klebsiella* y *Enterobacter* (+) de *Escherichia* (−). Caracterizar los miembros del género *Bacillus*

ción de enterobacterias, ya que habitualmente son los agentes etiológicos de las infecciones del tracto urinario e intestinal (*véase* Sección 24.1).

También están disponibles distintos kits dependientes de crecimiento de rápida identificación para otros grupos bacterianos o incluso para especies bacterianas únicas. Por ejemplo, se han desarrollado kits comerciales que contienen una batería de pruebas para *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria gonorhoeae*, *Haemophilus influenzae* y *Mycobacterium tuberculosis*. Se dispone igualmente de kits para la identificación de los hongos patógenos *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* (Sección 27.7).

Generalmente, es el microbiólogo clínico quien toma la decisión de utilizar una prueba diagnóstica específica. Para ello tiene en cuenta la naturaleza de la muestra clínica, las características básicas (especialmente la tinción de Gram) de los cultivos puros obtenidos y la experiencia previa en casos similares.

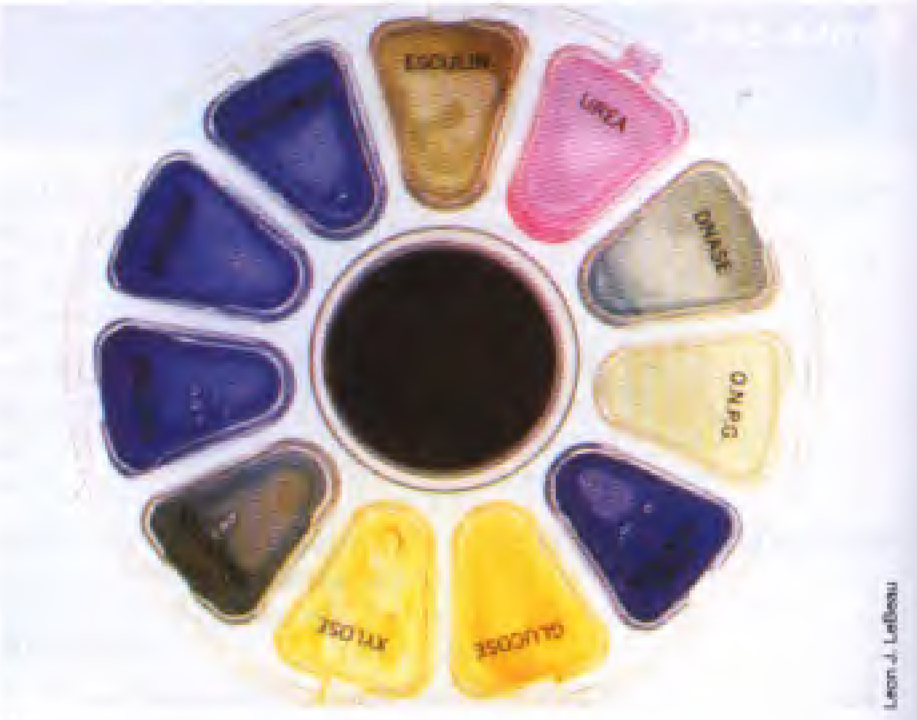

(a)

(b)

(c)

ONPG ADH LDC ODC CIT H2S URE TDA IND VP
GEL GLU MAN INO SOR RHA SAC MEL AMY
Leon J. LeBeau

(d)



(e)

Figura 24.7 Métodos de diagnóstico que dependen del crecimiento de las bacterias, utilizados para la identificación de aislados clínicos mediante cambios de color en distintos medios diagnósticos. (a) Uso de un medio diferencial para valorar la fermentación de azúcar. El cambio de color de un indicador de pH que se añade al medio líquido señala la producción de ácido. Si se produce gas, aparece una burbuja en el vial invertido de cada tubo. De izquierda a derecha: ácido, ácido y gas, negativo, no inoculado. (b) Prueba diagnóstica convencional para enterobacterias en un medio llamado *agar hierro triple azúcar (TSI)*. Se siembra el medio en la superficie inclinada y en profundidad. El medio contiene una pequeña cantidad de glucosa, y una gran cantidad de lactosa y sacarosa. Los organismos que son capaces de fermentar solamente la glucosa dan lugar a la formación de ácido solamente en el fondo del tubo, mientras que los organismos fermentadores de lactosa o sacarosa también pueden inducir la formación de ácido en la parte superior. La formación de gas se observa por la rotura del agar en el fondo. La formación de sulfuro de hidrógeno (por degradación proteica o bien a partir de la reducción del tiosulfato en el medio) es visible por un ennegrecimiento debido a la reacción del H_2S con el ion ferroso en el medio. De izquierda a derecha: fermentación de la glucosa solamente; reacción negativa; formación de sulfuro de hidrógeno; fermentación de glucosa y otro azúcar. (c) Medida de la utilización del citrato por *Salmonella* en el agar citratado de Simmons. El cambio de pH provoca un viraje en el color del indicador. De izquierda a derecha: positivo, negativo, no inoculado. (d) Medios comerciales usados en la identificación rápida de aislados clínicos. El principio es el mismo que en (*a*), pero se ha miniaturizado la disposición de conjunto para poder así realizar numerosas pruebas a la vez. Se muestran cuatro tiras distintas, cada una para un cultivo diferente. (e) Otra disposición de una prueba comercial miniaturizada. Ésta define la utilización de azúcar en organismos no fermentadores.

✓ 24.2 Revisión de conceptos

Los métodos tradicionales para la identificación de patógenos se basan en la observación de los cambios metabólicos que se producen durante el crecimiento. Estos métodos dependientes del crecimiento proporcionan un medio rápido y razonablemente seguro para diagnosticar muchas infecciones.

- ✓ Distinga entre métodos de identificación *selectivos* y *diferenciales*. Dé un ejemplo de medio utilizado en cada caso.
- ✓ ¿Qué parámetros utilizaría un microbiólogo clínico para recomendar el uso de un *kit* de prueba diagnóstica específica para la identificación de un agente infeccioso?

24.3 Cultivos de prueba de sensibilidad antibiótica

En la práctica médica, los cultivos microbianos se aislan a partir de enfermos con el fin de confirmar el diagnóstico y ayudar en la toma de decisiones sobre el tratamiento. De hecho, una de las tareas más importantes de un microbiólogo clínico es la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos de los aislados microbianos.

En el Capítulo 20 abordamos los principios para cuantificar la actividad antimicrobiana. Se puede medir fácilmente la sensibilidad de un cultivo por un método de difusión en agar o utilizando una técnica de dilución en tubo para determinar la *concentración inhibitoria mínima* (CIM) de un agente que inhiba el crecimiento (Sección 20.4). Las directrices de la Food and Drug Administration (FDA) controlan actualmente las técnicas que se emplean para analizar la sensibilidad en EE.UU, existiendo directrices parecidas en otros países.

El método de la CIM para el análisis de la sensibilidad antibiótica conlleva un *ensayo de dilución del antibiótico*, ya sea en tubos de cultivo (Figura 20.10) o bien en pocillos de una placa de microtitulación (Figura 24.8*e*). Se hacen diluciones seriadas al doble para cada antibiótico en los pocillos y después se inoculan todos los pocillos con una cantidad estándar del mismo organismo de prueba. Tras la incubación puede observarse la inhibición del crecimiento diferentes antibióticos midiendo la turbidez. Habitualmente, la sensibilidad se expresa como la *máxima dilución* (menor concentración) del antibiótico que inhibe completamente el crecimiento. Se trata de una técnica fácilmente automatizable debido a la realización de la prueba de dilución en placas de microtitulación.

Una técnica recomendada de difusión en agar se denomina *método de Kirby-Bauer*, llamada así en honor a sus descubridores (Figura 24.8). Se inocula una placa con un medio de cultivo adecuado distribuyendo una muestra de cultivo uniformemente por toda la superficie del agar. Después, se colocan sobre la placa discos de papel de filtro con una concentración conocida de distintos antimicrobianos. Cada disco tiene especificada la concentración de antimicrobiano y, tras la incubación, se anotan la presencia y el tamaño de las zonas de inhibición alrededor de los discos. La Tabla 24.4 presenta los tamaños de zonas de inhibición características para distintos antibióticos. Las zonas que se

TABLA 24.4 Tamaños de las zonas de inhibición en algunas pruebas de susceptibilidad a discos de antimicrobianos

	Diámetro de la zona de inhibición (mm)[a]			
Antibiótico	**Cantidad en el disco**	**Resistente**	**Intermedia**	**Sensible**
Ampicilina[b]	10μg	11 o menos	12-13	14 o más
Ampicilina[c]	10μg	28 o menos	—	29 o más
Cefoxitina	30μg	14 o menos	15-17	18 o más
Cefalotina	30μg	14 o menos	15-17	18 o más
Cloranfenicol	30μg	12 o menos	13-17	18 o más
Clindamicina	2μg	14 o menos	15-16	17 o más
Eritromicina	15μg	13 o menos	14-17	18 o más
Estreptomicina	10μg	11 o menos	12-14	15 o más
Gentamicina	10μg	12 o menos	13-14	15 o más
Kanamicina	30μg	13 o menos	14-17	18 o más
Meticilina[c]	5μg	9 o menos	10-13	14 o más
Neomicina	30μg	12 o menos	13-16	17 o más
Nitrofurantoína	300μg	14 o menos	15-16	17 o más
Penicilina G[d]	10 unidades	28 o menos	—	29 o más
Penicilina G[e]	10 unidades	11 o menos	12-21	22 o más
Polimixina B	300 unidades	8 o menos	9-11	12 o más
Tetraciclina	30μg	14 o menos	15-18	19 o más
Trimetroprim-sulfametoxazol	1,25/23,75 μg	10 o menos	11-15	16 o más
Tobramicina	10μg	12 o menos	13-14	15 o más

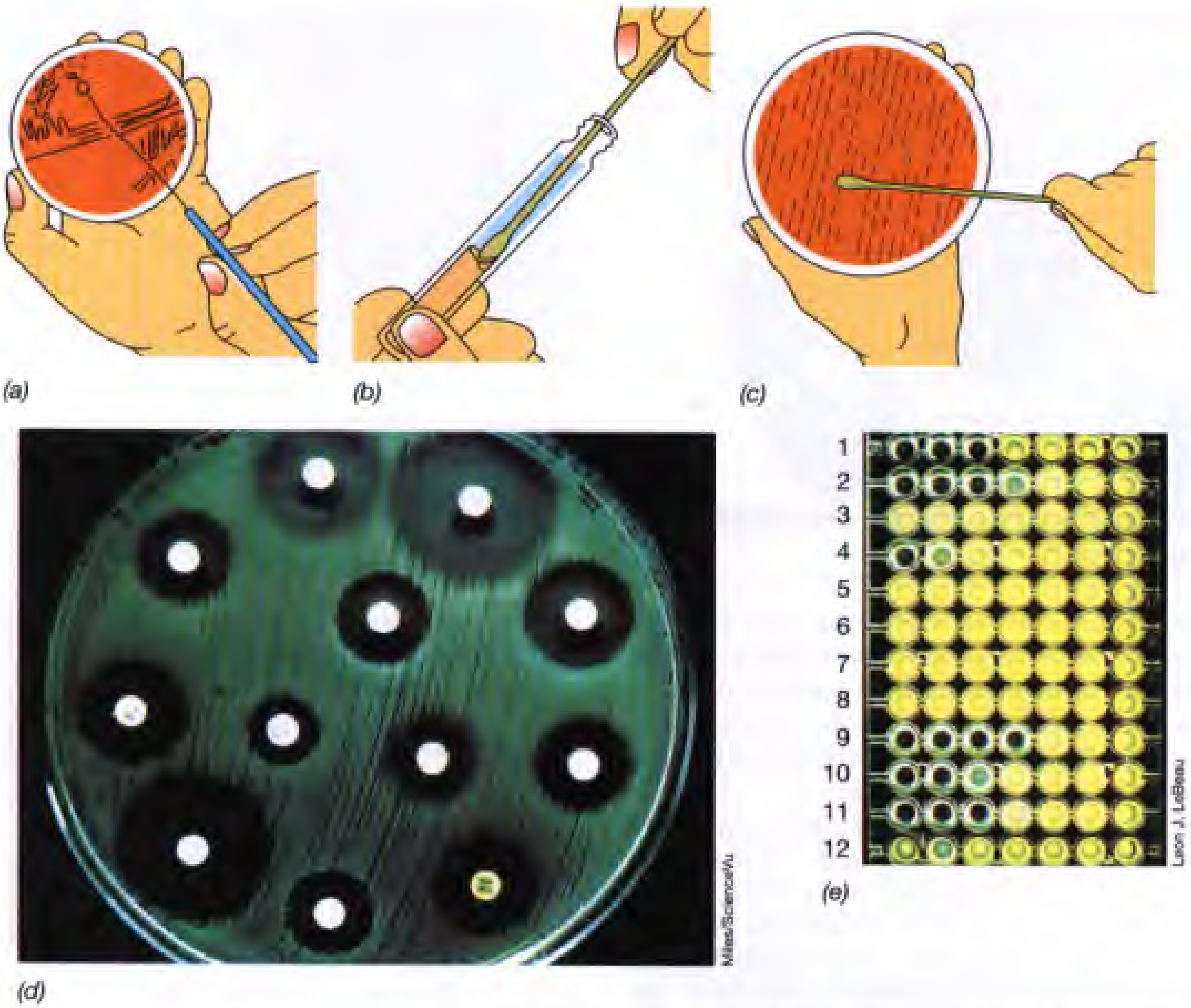
[a] *Véase* Figura 24.8*d* para la ilustración de una prueba típica.

[b] Para organismos Gram negativos y enterococos.

[c] Para estafilococos y organismos muy sensibles a la peniclina.

[d] Para estafilococos.

[e] Para organismos distintos a los estafilococos. Incluye algunos organismos como enterococos y algunos bacilos Gram negativos, que pueden producir algunas infecciones sistémicas, que se tratan con dosis altas de peniclina G.



Miles/ScienceVU

Leon J. LeBeau

Figura 24.8 Prueba de sensibilidad a los antibióticos. (a-d) Método de Kirby-Bauer para la determinación de la sensibilidad de un organismo a los antibióticos. (a) Se toma con el asa de siembra una colonia de la placa de agar. Se inocula en un tubo de medio de cultivo líquido y se deja que crezca hasta una densidad óptica determinada. (b) Se sumerge una torunda en el cultivo líquido. (c) Con la torunda se hacen estrías uniformemente sobre una placa de agar estéril. (d) Sobre la placa se colocan discos que contienen cantidades conocidas de distintos antibióticos. Después de la incubación se observan zonas de inhibición. La sensibilidad del organismo se establece por comparación en una gráfica de tamaños de la zona (Tabla 24.4). (e) Sensibilidad a los antibióticos determinada por el método de dilución. El organismo utilizado es *Pseudomonas aeruginosa.* Cada fila posee un antibiótico diferente. El empleo de placas de microtitulación permite la automatización de estas pruebas. La lectura del punto final corresponde al pocillo con menor concentración de antibiótico que no presenta evidencia de crecimiento bacteriano. El pocillo de la izquierda muestra la mayor concentración de antibiótico; en los pocillos de la derecha se hacen diluciones seriadas. Por ejemplo, en las filas 1 y 2 el punto final corresponde al tercer pocillo; en la fila 3, el antibiótico resulta ineficaz a la concentración ensayada puesto que existe crecimiento bacteriano en todos los pocillos; en la fila 4, el punto final corresponde al primer pocillo. Para un determinado agente la concentración inhibitoria mínima (CIM) (Sección 20.4) se define como la menor concentración de antibiótico que inhibe totalmente el crecimiento bacteriano.

ven sobre las placas se miden y se comparan con datos estándar para establecer si el aislado es verdaderamente sensible a un determinado antibiótico.

La resistencia antibiótica es un fenómeno muy extendido (Sección 20.12) y explica la importancia de la prueba de sensibilidad antibiótica para los patógenos aislados de todos los enfermos. La Tabla 24.4 muestra datos muy útiles para el médico a la hora de escoger el mejor antibiótico ante una infección bacteriana específica. Por fortuna, muchos patógenos potenciales son susceptibles a distintos antibióticos, lo que facilita la labor del médico en el curso del tratamiento; sin embargo, algunos patógenos, como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, son sensibles a muy pocos medicamentos. Otros patógenos, como los que existen en el medio hospitalario, han desarrollado resistencia a los antibióticos (Sección 20.12), de ahí que sea absolutamente esencial la prueba de sensibilidad antibiótica para estos organismos, a fin de realizar una quimioterapia eficaz. Estos informes, denominados **antibiogramas**, indican la sensibilidad de los organismos aislados clínicamente a los antibióticos de uso actual. Este informe resulta particularmente valioso para seguir la pista a la emergencia de cepas de patógenos resistentes a antibióticos, en centros como hospitales y hospicios.

✓ 24.3 Revisión de conceptos

Los antibióticos se utilizan con profusión en el tratamiento de las infecciones. Debe analizarse la sensibilidad de los patógenos a distintos antibióticos antes del tratamiento para una quimioterapia adecuada. Esta aproximación tan rigurosa se usa normalmente en hospitales.

- ✓ Describa la técnica de Kirby-Bauer. ¿Qué es lo que indica?
- ✓ ¿Por qué es importante para el microbiólogo clínico, el médico y el enfermo la prueba de sensibilidad antibiótica?

24.4 Seguridad en el laboratorio clínico

Los laboratorios clínicos, por su propia naturaleza, son áreas en las que a diario se manejan muestras biológicas potencialmente peligrosas. De ahí que deba establecerse un protocolo definido para el manejo de muestras clínicas con objeto de evitar accidentes de laboratorio. En EE.UU, la ley establece que toda institución clínica y de investigación que trabaje con tejido humano o de primate, cumpla un plan de control en el trabajo, en los lugares donde se manejen patógenos que se transmitan a través de la sangre. Esta ley fue especialmente diseñada para proteger a los trabajadores de la infección por el virus de la hepatitis B (VHB) (Sección 26.11) y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Sección 26.14), si bien protege eficazmente a los trabajadores de la infección por prácticamente cualquier patógeno, como consecuencia de las estrictas precauciones tomadas.

Los estudios de infecciones adquiridas en el laboratorio han puesto de manifiesto que la mayoría de dichas infecciones no se deben a exposiciones o accidentes conocidos sino que son el resultado del manejo diario de muestras del enfermo. Las dos causas más habituales de accidentes de laboratorio son la ignorancia y la falta de cuidado. Los aerosoles infecciosos que se producen durante el procesamiento de la muestra, representan la causa más probable de infecciones de laboratorio. Los intentos de minimizar la exposición de los clínicos a los agentes infecciosos, y así disminuir el número de infecciones de laboratorio no accidentales, ha llevado a los laboratorios clínicos bien organizados a poner de relieve las normas de seguridad que aquí se describen. La aplicación rigurosa de estas normas evita la diseminación del patógeno y satisface los requerimientos legales de la ley norteamericana.

1. Los laboratorios que manejan materiales peligrosos deben restringir el acceso al recinto y apoyar al personal. Estos individuos deben conocer los riesgos biológicos inherentes a los laboratorios clínicos y actuar en consecuencia.

2. Los procedimientos eficaces para la descontaminación de materiales o residuos infecciosos, incluyendo muestras, jeringas y agujas, medios de inoculación, cultivos bacterianos, cultivos de tejidos, animales de experimentación, vidrio, instrumentos y superficies, deben colocarse adecuadamente y ejecutarse sin compromiso. Para la descontaminación de material infeccioso que se haya derramado se recomienda una solución de hipoclorito (lejía del 5,25%) u otro desinfectante aprobado. Todo material de desecho potencialmente infeccioso debe quemarse en un incinerador o ser manejado por un manipulador de residuos autorizado.

3. Debe vacunarse correctamente al personal que trabaje con agentes infecciosos o vacunas peligrosas (por ejemplo, vacunas de la rabia, polio o difteria-pertusis). Las personas que trabajen con tejido humano o de primate deben vacunarse contra el VHB.

4. Todas las muestras clínicas deben ser consideradas como potencialmente infecciosas y manejarse de forma pertinente. Esto es especialmente importante para la prevención de hepatitis adquirida en el laboratorio debido a la relativa frecuencia del virus de la hepatitis en muestras clínicas (Sección 26.11).

5. Todos los pipeteos deben hacerse con dispositivos de pipeteo automático (no con la boca), y las jeringas, agujas y centrífugas clínicas deben emplearse siempre con un equipo biológico adecuado.

6. El manejo de animales debe realizarse exclusivamente por personal de laboratorio adiestrado, debiéndose recurrir a los anestésicos o tranquilizantes para evitar el daño tanto al personal como a los animales.

7. El personal de laboratorio debe llevar puesto batas de laboratorio, zapatos sellados, guantes de látex, máscaras, protección ocular, dispositivos de respiración cuando sean necesarios, y otras barreras de protección cuando se estime oportuno, según el nivel de exposición y la gravedad de la infección potencial. Estos dispositivos de barrera deben igualmente ser almacenados adecuadamente y descontaminados después de su utilización. El personal de laboratorio debe cuidar igualmente la higiene personal en lo que se refiere al lavado de manos. Nunca estará permitido en el laboratorio clínico comer ni beber, aplicarse crema de labios o llevar lentes de contacto.

8. Teniendo en cuenta los riesgos especiales que se asocian con el SIDA, todas las muestras clínicas deben tratarse como si tuvieran VIH. Siempre que se maneje una muestra de *cualquier* tipo, debe usarse guantes de látex o de vinilo. La posibilidad de producir un aerosol durante la preparación de la muestra, obliga a llevar máscaras continuamente. Las jeringas no deben volverse a calentar, doblar o romper; deben colocarse en un contenedor etiquetado diseñado expresamente para este fin que debe ser sellado y autoclavado antes de desecharlo.

Estas normas de seguridad deberían constituir la regla para todos los laboratorios clínicos. Los laboratorios clínicos especializados pueden tener otras normas para garantizar un ambiente de trabajo seguro. Por ejemplo, si el personal de laboratorio maneja rutinariamente patógenos aerógenos muy peligrosos (como el agente etiológico de la tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*), debe dotarse al laboratorio de dispositivos especiales como salas con presión negativa, cabinas de seguridad biológica (Figura 20.4) y filtros de aire, para prevenir la liberación accidental del patógeno del propio laboratorio. En el análisis final, sin embargo, es la actitud del personal la responsable de la seguridad o inseguridad del laboratorio como lugar de trabajo. Cualquier laboratorio clínico es un lugar potencialmente peligroso para personal que no esté adiestrado, o para los que no deseen poner en práctica las medidas destinadas a prevenir la infección adquirida en el laboratorio.

✓ 24.4 Revisión de conceptos

La seguridad en el laboratorio requiere un entrenamiento y planificación eficaces y un cuidado en la prevención de la infección en los que trabajan con patógenos en el laboratorio. Materiales como medios de cultivo inoculados, agujas y muestras de enfermos requieren precauciones específicas para un manejo seguro.

- ✓ ¿Cuáles son las principales precauciones necesarias para prevenir la diseminación de un patógeno que se transmite a través de la sangre entre el personal de laboratorio?
- ✓ ¿Cuáles son las principales causas de infección adquirida en el laboratorio?

II

INMUNOLOGÍA Y MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CLÍNICO

El inmunodiagnóstico es utilizado frecuentemente en el laboratorio clínico para la detección de patógenos específicos y de sus productos. Son usados para confirmar los casos de crecimiento y también para identificar los agentes etiológicos cuando el crecimiento falla. Cuando los test de crecimientono son rutinariamente posibles y cuando hay dificultades grandes para conseguirlo, como en el caso de las infecciones víricas, incluido el VIH, el inmunodiagnóstico proporciona un método relativamente simple para identificar el patógeno.

24.5

Inmunodiagnóstico para enfermedades infecciosas

El inmunodiagnóstico detecta la respuesta inmunitaria para las moléculas del patógeno. En muchos casos~~la~~ respuesta inmnunitaria del paciente puede indicar infección por patógeno. En otros casos, los anticuerpos son usados para identificar el patógeno *in vitro*.

Inmunidad para la infección

En el Capítulo 22 se explicó la respuesta inmune. En la Figura 22.2 se resumen los aspectos más relevantes de la inmunidad. La respuesta del organismo a los patógenos es un proceso en tres etapas. Cuando el patógeno nunca ha entrado en contacto con el organismo, en primer lugar el patógeno ha de ser reconocido. Habitualmente este reconocimiento corre a cargo de un grupo de células llamadas fagocitos (Sección 22.2). Por fortuna, los fagocitos ingieren y destruyen la mayoría de patógenos (un proceso denominado *fagocitosis*). La fagocitosis es *inespecífica* y la diana puede ser cualquier sustancia extraña, incluyendo los patógenos y sus componentes.

En la segunda fase de la inmunidad, los fagocitos presentan los *antígenos* derivados del patógeno (proteínas del patógeno destruido) a linfocitos específicos de antígeno denominados células T (Sección 22.1). Algunas células T se denominan células T colaboradoras (T_H) porque no actúan directamente sobre el patógeno sino que reclutan y estimulan (colaboran) otro grupo de células específicas de antígeno denominadas células. Un tipo de las células T_H, las células específicas de antígeno T_H1, atraen y activan a los fagocitos como macrófagos y neutrófilos, causando la inflamación y limitando el progreso de la infección (Sección 22.7). Las T_H2 activan las células B, que responden entonces produciendo proteínas solubles específicas de antígeno denominadas *anticuerpos* (Secciones 22.8 y 22.9). En los 5 primeros días se produce habitualmente una *respuesta primaria de anticuerpos*, si bien los anticuerpos no alcanzan cantidades máximas durante varias semanas. Los anticuerpos, al ser específicos de antígeno y por tanto específicos de patógeno, son componentes críticos de la respuesta inmune.

Los anticuerpos interaccionan específicamente con el antígeno sobre las células diana pero no matan las células. Existe un grupo de enzimas inespecíficas conocido en conjunto como «complemento» (Sección 22.10), que puede fijarse a los anticuerpos unidos al patógeno y lisar las células con el anticuerpo unido. Por ejemplo, anticuerpos específicos contra proteínas de la superficie de *Salmonella* spp. interaccionan sólo con *Salmonella*: el complemento provoca la lisis de la célula de *Salmonella* sensibilizada por el anticuerpo, pero no la de las células de *Escherichia coli* que no están sensibilizadas por el anticuerpo. Por tanto, la respuesta inmune es *específica* para antígenos individuales y depende de anticuerpos específicos, pero puede ser mediada o estimulada a través de mecanismos no específicos como el complemento.

En muchos casos, la inmunidad mediada por anticuerpos no es un mecanismo eficaz para controlar la diseminación de la infección. Algunos agentes infecciosos parasitan el organismo desde el *interior* de las células. Por ejemplo, los virus animales se reproducen utilizando los sistemas celulares del hospedador y, en consecuencia, gran parte de su ciclo vital transcurre en el interior de las células del hospedador (Sección 9.10). De igual modo, bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico de la tuberculosis, se mantiene preferentemente en el interior de los fagocitos (Secciones 22.2 y 26.5). Teniendo en cuenta que los anticuerpos están armados para reconocer el patógeno libre en la sangre o en las superficies mucosas, las células infectadas del hospedador deben ser identificadas y destruidas por diferentes medios, generalmente a través de interacciones célula a célula propias de la *inmunidad celular*. Por fortuna, todos los patógenos endógenos producen antígenos que a su vez son presentados sobre la superficie de células diana infectadas. El antígeno es reconocido por una célula T citotóxica (T_C) y actúa directamente sobre la célula diana infectada secretando proteínas citolíticas, llamadas *perforinas*, que destruyen la célula infectada (Sección 22.6).

Antes de la exposición al antígeno no existe inmunidad específica útil, pero tras la exposición al antígeno aparecen células T y B inmunes, y se detectan anticuerpos circulantes hasta un cierto nivel pudiendo persistir durante años. Pero lo que es más importante, las células que son capaces de fabricar anticuerpos aparecen ahora en grandes cantidades. Una segunda estimulación antigénica por reinfección genera una respuesta inmune muy rápida y extraordinariamente potente que alcanza su máximo en unos días, casi siempre a una intensidad de varios órdenes de magnitud mayor que la respuesta primaria (Sección 22.9). Esta *respuesta secundaria de anticuerpos* localiza el patógeno rápidamente y lo destruye, de ahí que se diga que la respuesta inmune tiene *memoria*. La memoria se caracteriza por una elevación rápida del *título de anticuerpos* o cantidad; a partir de ahora emplearemos este principio para el seguimiento de las infecciones.

Títulos de anticuerpos, test de piel y diagnóstico de enfermedad infecciosa

En el diagnóstico de una enfermedad infecciosa no siempre es posible el aislamiento del patógeno. Una posible alternativa, en estos casos, es cuantificar el **título** de anticuerpos frente al patógeno del que se sospecha. Como se expuso con anterioridad, cuando un individuo sufre una infección de la que es sospechoso el patógeno etiológico, el título de anticuerpos frente a dicho patógeno debería elevarse. El título de anticuerpos puede medirse mediante aglutinación, precipitación, enzimoinmunoanálisis (ELISA), métodos de inmovilización o radioinmunoensayo (RIA), dependiendo de la situación. La técnica general consiste en establecer una serie de diluciones del suero (habitualmente diluciones al doble: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y así sucesivamente) y determinar la dilución *máxima* a la que se produce la reacción antígeno-anticuerpo. Estos métodos se denominan tests serológicos porque todos ellos utilizan suero del paciente.

Una *sola* medida del título de anticuerpos no indica infección activa. Después de la infección, muchos anticuerpos dan títulos altos durante mucho tiempo; para establecer que una enfermedad aguda se debe a un determinado patógeno, es esencial demostrar una *elevación* del título de anticuerpos en muestras sucesivas de suero del mismo enfermo. Habitualmente el título de anticuerpos es bajo durante la fase aguda de la infección y se eleva durante la convalecencia (Figura 24.9). Dicha elevación en el título de anticuerpos constituye la mejor indicación de que la enfermedad se debe al agente sospechoso y es también útil en el diagnóstico de la enfermedad infecciosa de naturaleza crónica, como ocurre en la fiebre tifoidea y la brucelosis. En algunos casos, sin embargo, la mera presencia de anticuerpos puede ser suficiente para indicar infección. Así sucede cuando el patógeno se presenta raramente en la población, de tal modo que la presencia de anticuerpos es suficiente para indicar la existencia de una infección en el individuo. Un ejemplo significativo es el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Sección 26.14). Discutiremos los métodos para la determinación de los anticuerpos anti VIH en las secciones 24.11 y 24.12.

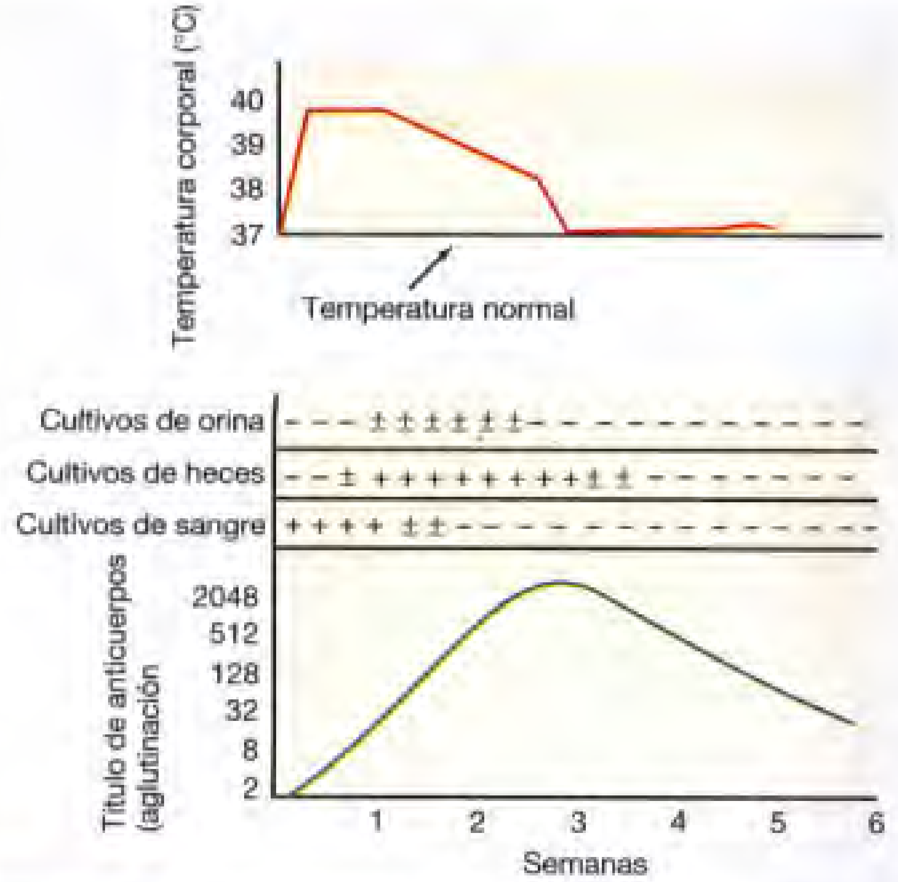


Figura 24.9 Curso de la infección en un enfermo típico con fiebre tifoidea no tratada. La toma de la temperatura corporal proporciona una medida de la evolución de los síntomas clínicos. El título de anticuerpos se mide determinando la mayor dilución que produce la aglutinación de una cepa de prueba de *Salmonella typhi*. El título se muestra como el recíproco de la cantidad máxima de anticuerpo usada en la aglutinación. La presencia de bacterias viables en sangre, heces y orina se determina a partir de cultivos periódicos. Obsérvese que el aclaramiento del patógeno de la sangre ocurre a medida que aumenta el título de anticuerpos, y que se requiere mayor tiempo para su aclaramiento de heces y orina. La temperatura corporal desciende a valores normales a medida que aumenta el título de anticuerpos. Estos datos no proceden de un solo paciente sino que son un resumen de los resultados obtenidos de un gran número de enfermos.

Desafortunadamente, no todas las infecciones dan lugar a la formación de anticuerpos generalizados. Cuando el patógeno está muy localizado, la inducción de una respuesta inmune es mínima y no se produce un incremento en el título de anticuerpos, incluso en el caso de que el patógeno prolifere profusamente en el foco infeccioso. Un buen ejemplo lo representa la gonorrea. Esta infección debida a *Neisseria gonorrhoeae* no desencadena una respuesta inmune generalizada y, por tanto, no suele ser habitual que se produzca una reinfección en un individuo ya curado (*véanse* Secciones 24.1 y 26.12).

La presencia de anticuerpos en el suero, en otros casos, puede deberse a la vacunación. De hecho, la cuantificación de la elevación del título de anticuerpos tras la vacunación es una de las mejores formas para determinar la eficacia de la vacunación.

La *prueba de piel* es otra manera de determinar exposición a un patógeno. La más común de estas pruebas es la *prueba de la tuberculina*, que consiste en inyectar intradérmicamente un extracto de *Mycobacterium tuberculosis*. Una inflamación en el lugar donde se produjo la inyección 48 horas después indica estado de infección o exposición pre-

TABLA 24.5 Algunas técnicas clínicas inmunológicas para la identificación de agentes infecciosos

Patógeno o enfermedad	Antígeno	Técnica serológica[a]
VIH (SIDA)	Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	ELISA
Borrelia burgdorferi (enfermedad de Lyme)	Flagelina Proteínas de superficie	ELISA Immunoblot Prueba bactericida (Sección 27.4)
Brucella	Antígeno de la pared celular	Aglutinación
Candida albicans (enfermedad por levaduras)	Estracto soluble de proteínas fúngicas	Prueba cutánea
Corynebacterium diphtheriae (difteria)	Toxina	Prueba cutánea (prueba de Schick)
Virus de la gripe	Suspensiones de virus de la gripe Células de la nasofaringe conteniendo virus de la gripe	Ensayo basado en el complemento Inmunofluorescencia
Mycobacterium leprae (lepra)	Lepromina (estracto soluble de proteínas bacterianas)	Prueba cutánea
Mycobacterium tuberculosis (tuberculosis)	Tuberculina (proteínas bacterianas purificadas parcialmente, PPD)	Prueba cutánea
Neisseria meningitidis (meningitis)	Polisacárido capsular	Hemaglutinación pasiva (el polisacárido de *N. meningitidis* se adsorbe a los eritrocitos)
Pneumocystis carinii (infección en los pulmones)	Células de *P. carinii*	Inmunofluorescencia
Enfermedades por ricketsias (fiebre Q, tifus, fiebre maculosa de las Montañas Rocosas)	Células muertas de ricketsias	Ensayo basado en el complemento o pruebas de aglutinación de células ELISA
Salmonella (gastroenteritis)	Antígeno O o H	Aglutinación (prueba de Widal) ELISA
Streptococcus (grupo A) (garganta inflamada y fiebre escarlata)	Estreptolisina O (exotoxina) DNasa (proteína extracelular)	Neutralización de la hemólisis Neutralización de la enzima
Treponema pallidum (sífilis)	Cardiolipina-lecitina-colesterol	Prueba de floculación [Venereal DiseaseResearch Laboratory (VDRL)]
Vibrio cholerae (cólera)	Antígeno O	Aglutinación Prueba bactericida (en presencia del complemento) ELISA

[a] Salvo en las pruebas cutáneas y en las pruebas de inmunofluorescencia, se analiza el suero del enfermo para detectar anticuerpos contra los antígenos específicos. La prueba cutánea para *C. albicans*, *M. tuberculosis* y *M. leprae indica* T_H1 hipersensibilidad retardada. Para *C. diphyheriae* la prueba de Schick detecta anticuerpos en suero neutralizantes de la toxina. Todos los demás test se usan para medir los niveles de anticuerpos del suero.

via a *M. tuberculosis*. Esta prueba indica inmunidad retardada causada por células Th1 (Sección 22.13). Estas pruebas se utilizan rutinariamente para el diagnóstico de la tuberculosis y la lepra (Sección 26.5), así como de una variedad de enfermedades fúngicas (Sección 27.7).

Algunas de las pruebas más comunes para el inmunodiagnóstico se pueden ver en la Tabla 24.5.

✓ 24.5 Revisión de conceptos

Una respuesta inmune es el resultado natural de una infección. Se puede utilizar una respuesta inmune específica, particularmente los títulos de anticuerpos y las pruebas de piel, para proveer información válida relativa a las infecciones pasadas y presentes y en la convalescencia.

- ✓ Describa el desarrollo de un título de anticuerpos positivo para un patógeno en la fase aguda y la convalescencia de la enfermedad.
- ✓ Describa el método, el tiempo y la racionalidad para la prueba de la tuberculina. ¿Qué componente de la respuesta inmune detecta esta prueba?

24.6 Anticuerpos policlonales y monoclonales

Como ya se expuso en la Sección 22.4, la respuesta humoral (*véanse* Secciones 22.8 y 22.9) normal a un antígeno significa que muchas células B son estimuladas para producir anticuerpos frente un antígeno complejo. Sólo un número concreto de las inmnunoglobulinas están dirigidas frente a un antigénico determinante (epítopo). El antisuero resultante es una mezcla de diferentes anticuerpos y se conoce como un anticuerpo **policlonal**. Aunque esta población de anticuerpos puede conferir una protección adecuada al hospedador, generalmente es específica para una variedad de determinantes. Estos anticuerpos no son precisamente reproducibles porque son la suma de muchos anticuerpos producidos por un animal en un tiempo concreto. Para fines diagnósticos, estos anticuerpos, aunque muy potentes, son muy difíciles de estandarizar.

Sin embargo cada inmunoglobulina es producida por una sola célula B (Sección 22.9) y una célula B clonada puede producir *in vitro* cantidades ilimitadas de una inmonoglobulina específica. Por otra parte, los anticuerpos **monoclonales** son productos de clones de células únicas. Los clones de células B pueden guardarse y congelarse, y luego pueden ser reactivados proveyendo una fuente inagotable de anticuerpos específicos. La tecnología de los anticuerpos monoclonales ha suplantado de este modo a las técnicas policlonales estándar en muchas aplicaciones inmunodiagnósticas. La Tabla 24.6 compara las propiedades de los anticuerpos monoclonales y policlonales.

Anticuerpos monoclonales e hibrodomas

Los linfocitos productores de anticuerpos normalmente mueren a las pocas semanas (*in vitro*), por lo tanto, hay que modificar los linfocitos B para permitirles vivir en cultivo. Los linfocitos productores de anticuerpos son fusionados con células B tumorales, a las que se denominan *mielomas*. Un mieloma puede dividirse indefinidamente *in vitro*. Por ejemplo, la célula inmortal que se produce al fusionar una célula B a un mieloma se denomina *hibridoma*. El hibridoma comparte las dos propiedades de las células que se fusionan: crecer indefinidamente *in vitro* y producir anticuerpos (Figura 24.10).

Para producir un anticuerpo de interés se inmnunizaa un ratón con un antígeno concreto. Durante las semanas siguientes las células B se dividen y el ratón empieza a producir anticuerpos (Sección 22.9). El bazo, que es rico en células B, se le quita al ratón y se fusiona con un mieloma (Figura 24.10). Sin embargo el número de hibridomas viable es sólo un bajo porcentaje de las células totales. Los hibridomas son seleccionados por adicción de *h*ypoxantina, *a*minopterina y *t*imidina en el medio de cultivo *in vitro* (medio de cultivo HAT). El medio HAT para el crecimiento de las células que no están fusionadas, porque son incapaces de utilizar la hipoxantina y timidina por bloquear la aminopterina su metabolismo (un veneno celular). Los hibridomas son capaces de vivir en HAT porque reciben esta información de la célula B. Las células sin fusionar mueren al poco tiempo porque no pueden vivir sólo unas pocas divisiones celulares. Después de la fusión los productores de anticuerpos deben ser identificados.

Un ELISA muy sensible (*véase* Sección 24.11) se puede usar para identificar los hibridomas que producen anti-

TABLA 24.6 Características de los anticuerpos monoclonales y policlonales

Policlonales	Monoclonales
Contiene muchos anticuerpos reconociendo muchos determinantes de un antígeno	Contiene un sólo anticuerpo reconociendo sólo un antígeno
Varias clases de anticuerpos están presentes (IgG, IgM, etc.)	Se produce una sola clase de anticuerpo
Puede hacer un anticuerpo específico usando sólo un antígeno muy purificado	Puede hacer un anticuerpo específico usando un antígeno impuro
Reproducibilidad y estandarización difíciles	Muy reproducible

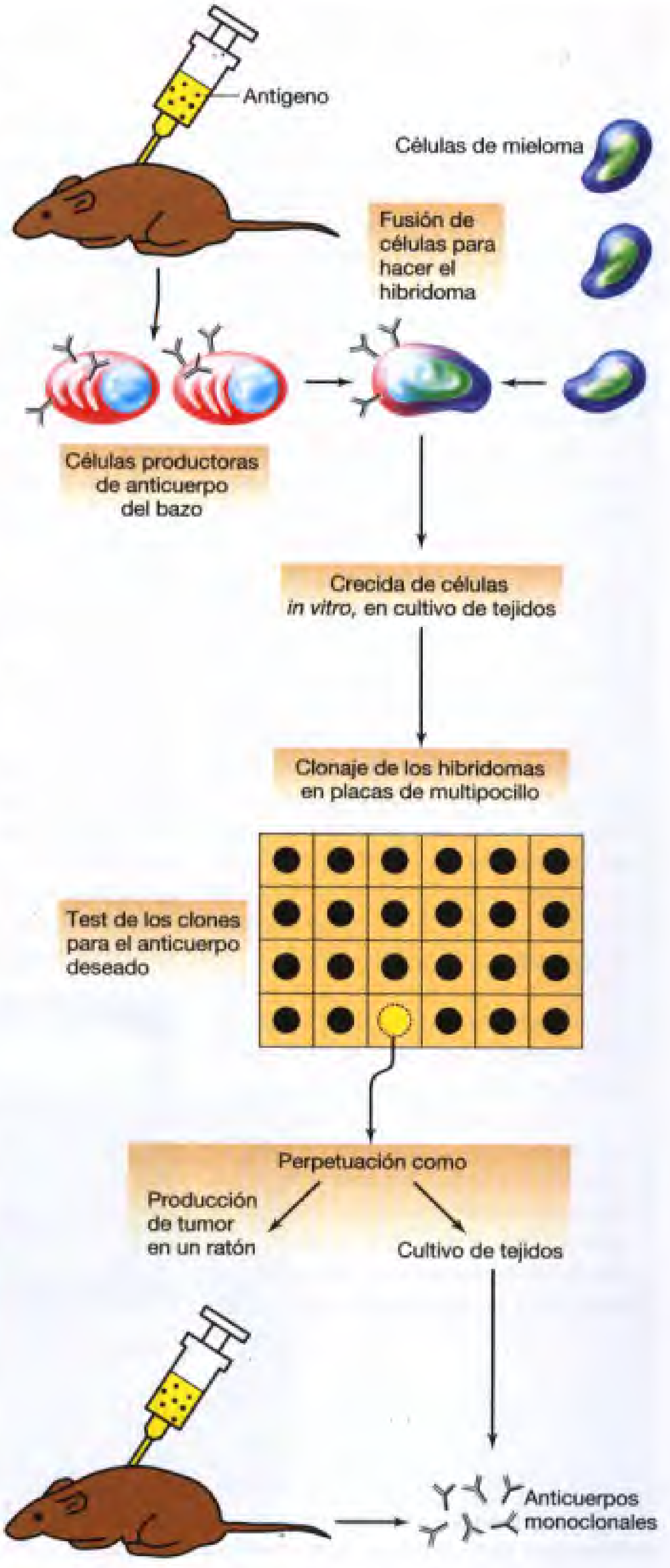

Antígeno
Células de mieloma
Fusión de células para hacer el hibridoma
Células productoras de anticuerpo del bazo
Crecida de células in vitro, en cultivo de tejidos
Clonaje de los hibridomas en placas de multipocillo
Test de los clones para el anticuerpo deseado
Perpetuación como
Producción de tumor en un ratón
Cultivo de tejidos
Anticuerpos monoclonales

Figura 24.10 La técnica del hibridoma y la producción de anticuerpos monoclonales. El hibridoma puede ser cultivado indefinidamente o pasado a través de animales como un tumor. Los hibridomas pueden ser congelados y reconstituidos en cultivo de tejidos o en animal adecuado.

Técnicas y Aplicaciones ... Test de orina para detectar el abuso de drogas

Muchas agencias del gobierno y empleados privados tienen programas para controlar el abuso de drogas en el puesto de trabajo. Si una persona usa drogas los metabolitos de éstas se secretan por la orina. El test de orina permite detectar el uso de drogas. El uso de tests para el canabis (marihuana), cocaína, fenilciclidina, anfetaminas, propoxofeno, benzodiacepina, opiáceos, esteroides y barbitúricos.

Dada la pequeña cantidad de drogas o metabolitos de drogas que se encuentrán en la orina, se usan métodos extremadamente sensibles pero estos métodos también tienen que ser muy específicos. Los procedimientos inmunológicos son los más utilizados porque son los más específicos y sensibles, para el control de la orina. Dos métodos son los más usados para la orina, el RIA y el ELISA. Para el ensayo en orina un anticuerpo debe prepararse para la droga y el metabolito de la droga. El anticuerpo reconoce un determinante antigénico de la droga. El ensayo se hace por un principio de *competición* entre el antígeno marcado y el antígeno sin marcar (la droga o el metabolito de la droga en orina) para el sitio de unión del anticuerpo específico. Tanto en el test RIA como en el ELISA, cuanto mayor sea la cantidad de droga que hay en la orina, menor será la droga marcada que se enlazará.

En el RIA, cantidades de droga marcada son añadidas a la orina, acompañadas de cantidades de anticuerpo para la droga. La presencia de la droga es determinada por la cantidad de anticuerpo unido al sustrato sólido. Como la concentración de la droga en orina crece, la radiactividad decrece. Concentracciones de droga de 1-5 mg/ml pueden ser detectadas en 1-5 horas. El test de RIA se utiliza a gran escala, porque se puede automatizar el pipeteo y el contaje.

En el ELISA, el antígeno (droga) es covalentemente unido a una enzima, comunmente glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, cuya actividad puede ser detectada por un simple ensayo colorimétrico. La enzima ligada a la droga es asociada con el anticuerpo, pierde la actividad enzimática y la enzima libre puede reaccionar con el sustrato. La orina se mezcla con un anticuerpo para la droga, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa-droga y la glucosa-6-fosfato. Si la droga está presente en la orina, compite con la enzima-droga por el anticuerpo, y más enzima está libre para reaccionar con el sustrato. Así cuanta más droga haya en la orina, el color será más intenso. El ELISA tiene la ventaja de que el tiempo es corto y el color se detecta de forma sencilla. Sin embargo el ELISA es menos sensible que el RIA. El ELISA es útil cuando un número pequeño de muestras requiere ser analizado y el sitio donde se recoge la orina está lejos del laboratorio. En ocasiones se ponen los reactivos en la tiras de papel, provomiendo que los que no tengan experiencia en el uso de reactivos puedan hacer la analítica (*véase* la foto). Para la gran escala, se han diseñado robots que pueden procesar hasta 18 000 muestras de orina por hora, cada muestra marcada por un código de barras.

Keystone Diagnostics, Inc.

Tanto monoclonales como policlonales pueden usarse en el test de orina. Los monoclonales tienen la ventaja de tener especificidad definida, pero no siempre tienen tan alta espeficidad por la droga como los policlonales bien seleccionados. La selección de un anticuerpo depende de la especififidad y la sensibilidad necesarias, del coste del producto y de la facilidad de uso.

Un problema que se plantea para los métodos inmnunológicos es la reactividad cruzada para los otros productos presentes en la orina. Por ejemplo, el ibuprofeno tiene rectividad cruzada con la marihuana en algunos test, y la histamina y la difenilhidramina pueden interferir en ELISA con la metadona, una droga controlada. Debido a los falsos positivos, hay que realizar una cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta precisión. Se dispone de métodos combinados de espectrometría de masas con cromatografía extremadamente sensibles, que son muy útiles para indentificar drogas poco frecuentes o drogas que sólo provocan una débil respuesta inmunitaria.

Los tests inmunológicos de orina han promovido su uso para el control de drogas en el puesto de trabajo. La inmunología ha probado que se puede usar para la detección de drogas en orina en la sociedad moderna. ■

cuerpos monoclonales. En una típica fusión se producen anticuerpos para muchos determinantes antigénicos distintos. Cuando los clones son identificados pueden crecer los hibridomas y los anticuerpos se pueden recolectar del sobrenadante de cultivo. Los hibridomas pueden crecer indefinidamente o también se pueden guardar congelándolos. Los hibridomas se pueden descongelar y producir anticuerpos específicos.

Usos diagnósticos y terapéuticos

Un anticuepo monoclonal, por lo general, es muy específico para un solo determinante antigénico y de ahí que sea extremadamente útil en inmunodiagnóstico, con aplicaciones ilimitadas (por ejemplo, *véase* el texto «Test de orina para detectar el abuso de drogas»). Los anticuerpos monoclonales son usados en general en tests de diagnóstico clínico, tipado inmunológico de bacterias e identificación de células

Atención a... Kits de inmunodiagnóstico a la venta

Actualmente un número de frabicantes hacen test de inmunodiagnóstico para público general. En todas las farmacias hay test de embarazo y test para determinar la ovulación en la mujer.

Estos tests se basan en la hormona secretada en la orina. Todos los test de embarazo detectan en la orina la gonotropina coriónica humana (HCG). Cuando el óvulo es fertilizado, produce HCG que funciona para mantener el cuerpo lúteo y mantener el embarazo. Cuando se mantiene el embarazo, el embrión mismo produce y libera cantidades de HCG. La hormona, producida ahora en grandes cantidades, es liberada a la corriente sanguínea, eliminada por los riñones y excretada con la orina. La menstruación normal que se produce de 10 a 14 días después de la ovulación, si el óvulo no es fertilizado, no tiene lugar y la HCG presente en la orina es suficientemente grande para ser detectada en este tipo de test. La detección de HCG en orina determina que la mujer está embarazada. Los tests advierten que se puede detectar el embarazo el mismo día de la pérdida de la menstruación, esto es de 10 a 14 días *después* de la fecundación, pero *no* el primer día de embarazo.

La sencillez es la clave del kit. Dado que no todo el mundo está entrenado en procesos de laboratorio, el test debe ser sencillo y los resultados fáciles de interpretar. Lo común es que la paciente saque una muestra de orina, en el test más sencillo la paciente moja la tira de papel en la orina. En otros test hay que pasar la orina por un filtro o meter la tira en la orina, y después meter la tira en otra solución. Los resultados se deben a un cambio de color: un cambio de color de la tira o filtro, de blanco a rosa (*véase* figura), durante 30 minutos o menos. Todos los tests comparten ciertos principios. La HCG de la orina es unida a un monoclonal que se inmoviliza en un soporte sólido, la tira o el filtro. Luego, un segundo monoclonal específico para la HCG en solución para la tira o el filtro reacciona con el anticuerpo inmovilizado HCG. Este segundo anticuerpo está unido a partículas de oro coloidal. Si el segundo anticuerpo reacciona con la HCG, se inmnoviliza y se muestra un color.

Estos tests son modificaciones de SPIA, y son usados por los médicos para diagnosticar enfermedades. Por ejemplo, un número de tests se emplea para la detección de antígenos de *Steptococcuus pyogenes*, que causa dolor de garganta. Normalmente requiere aislar e identificar el estreptococo, un proceso que necesita de material y personal preparado. Dado que se necesita incubar la muestra, la respuesta no estará preparada por lo menos en 16 horas. Los resultados se procesan en minutos, usando material antígeno de la garganta. Algunos kits están disponibles utilizando anticuerpos que reaccionan con las proteínas propias. Estos kits son habituales para la detección de enfermedades autoinmnunes, como la artritis reumatoide.

Estos tests tienen varias ventajas. Son fáciles de manejar, no requieren experiencia técnica, son poco caros y exactos; tienen vida larga y no requieren condiciones de almacenaje. Sin embargo, hay desventajas: son tests cualitativos, lo que significa que sólo se pueden usar cuando el resultado es absoluto. Por ejemplo, uno decide si la mujer está embarazada o no. Sin embargo la medición cuantitativa de los antígenos es necesaria en algún caso como, por ejemplo, en el test que determina si hay anutoanticuerpos. Además muchas empresas no presentan el control positivo o negativo, que aseguran que el test funciona de manera razonable. Los resultados se deben interpretar con precaución, y los resultados positivos o negativos pueden resultar erróneos cuando el test no ha estado bien realizado o faltan reactivos. ■

HCG-nostick
FIRST RESPONSE
Be Sure
FIRST RESPONSE
Be Sure

con antígenos extraños (por ejemplo, células infectadas con virus). Los anticuerpos monoclonales son usados para medir y cuantificar productos no detectados por otros métodos y son una gran promesa para el tipaje sanguíneo y la determinación del embarazo. Por ejemplo, en la determinación del embarazo, hay anticuerpos monoclonales que se utilizan para determinar hormonas específicas del mismo (*véase* el recuadro «Kits de inmunodiagnóstico a la venta»). Dada su especificidad se utilizan monoclonales para tratar el cáncer de humanos.

TABLA 24.7 Tipos de reacciones de antígeno-anticuerpo

Localización del antígeno	Factores accesorio requeridos	Reacción observada
Soluble	Ninguno	Precipitación (Sección 24.7)
En la célula o una partícula inerte	Ninguno	Aglutinación (Sección 24.8)
Flagelos	Ninguno	Inmobilización o aglutinación (Sección 24.8)
En la bactaria	Complemento	Lisis (Sección 22.10)
En la bactaria	Complemento	Muerte (Sección 22.10)
En el eritrocito	Complemento	Hemolisis (Sección 22.10)
Toxina	Ninguno	Neutralización (Sección 24.7)
Virus	Ninguno	Neutralización (Sección 24.7)
En la bactaria	Fagocitos y complemento	Fagocitosis (opsonización; Sección 22.10)

Las células malignas contienen un número grande de antígenos que no expresan las células normales. Los *antígenos tumorales* son específicos. Los anticuerpos monoclonales preparados contra los antígenos tumorales tienen como blanco específico las células malignas y se usan para liberar toxinas directa y específicamente contra ellas. Existen muchos tests clínicos donde se unen proteínas a anticuerpos tumorales. La especificidad de los tratamientos con anticuerpos antitumorales puede suponer una mejora de la quimioterapia anticancerosa por prevenir el uso de la quimioterapia y la radioterapia, que frecuentemente dañan la células tumorales y las normales.

✓ 24.6 Revisión de conceptos

Los anticuerpos policlonales y monoclonales son usados para la investigación y los ensayos clínicos. Los anticuerpos monoclonales (hibridomas) producen monoespecíficos y reproducibles para una gran variedad de propósitos clínicos, diagnósticos y de investigación.

✓ ¿Puede un anticuerpo policlonal reconocer una variedad de determinantes?

✓ ¿Qué ventajas tienen los anticuerpos monoclonales sobre los policlonales?

24.7 Reacciones antígeno-anticuerpo *in vitro*: serología

El estudio de las reacciones antígeno-anticuerpo *in vitro* es denominada **serología**. Las reacciones serológicas son la base de los tests de serología diagnóstica. La interacción específica se basa en el reconocimiento de la variedad antigénica por las regiones *variables* de los anticuerpos.

Una variedad de tests serológicos son usados para identificar antígenos, dependiendo de las propiedades del antígeno y de las condiciones elegidas de la reacción (Tabla 24.7).

Especificidad y sensibilidad

El uso de los tests serológicos es dependiente de la sensibilidad y especificidad. La **especificidad** es la habilidad de reconocer un antígeno individual. Un óptimo nivel de especificidad requiere que el anticuerpo reconozca un solo antígeno que no tenga reactividad cruzada con otro antígeno, lo que daría *falsos positivos*. La especificidad debe medirse de acuerdo con el control positivo y negativo del antígeno. La espeficidad para cada test debe medirse experimentalmente y ser verificada cuando el test se use.

La **sensibilidad** define la más baja cantidad de antígeno que puede ser detectado. El más alto grado de sensibilidad requiere que una sola molécula de antígeno sea detectada. La alta sensibilidad previene que reaccionen *falsos negativos*. La sensibilidad de algunos tests comunes se muestran en la Tabla 24.8, donde se muestra la cantidad de anticuerpo que se necesita para detectar el antígeno. La cantidad de antígeno detectado es proporcional a la cantidad de anticuerpo utilizado. Por ejemplo, las inmunoprecipitaciones requieren cantidades grandes de anticuerpos y generalmente detectan de 0,1 a 1,0 mg de antígeno. Por lo tanto, los tests de precipitación son los menos sensibles tests serológicos. En el otro extremo están los *ELISA* (*véase* Sección 24.11), que requieren 100 000 veces menos anticuerpo para detectar 1 millón de veces más de antígeno (0,1 a 1,0 ng). Por lo tanto los tests de ELISA son los más sensibles test serológicos.

TABLA 24.8 Sensibilidad de los análisis inmunodiagnósticos

Análisis	Sensibilidad (μg anticuerpo/ml)[a]
Reacción de precipitación	
En líquidos	24-160
En geles (inmunodifusión doble)	24-160
Reacciones de aglutinación	
Directas	0,4
Pasivas	0,08
Radioinmunoanálisis (RIA)	0,0008-0,008
Enzimoinmunoanálisis (ELISA)	0,0008-0,008
Inmunofluorescencia	8,0

[a] La menor cantidad de anticuerpo necesaria para dar una reacción positiva en presencia de antígeno.

Neutralización

La **neutralización** es la habilidad del anticuerpo para eliminar o reducir significativamente su actividad biológica. Las reacciones de neutralización pueden ocurrir tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por ejemplo, la inactivación de un anticuerpo por una toxina microbiana puede ocurrir cuando el anticuerpo se combina con la parte activa de la toxina y es bloqueada la toxina (Figura 24.11). La neutralización ocurre para muchas exotoxinas como se ve en la Tabla 21.4. Un anticuerpo que neutraliza la toxina es una *antitoxina*. Las reacciones de neutralización también pueden ocurir con virus, los anticuerpos bloquean el virus. Los anticuerpos frente a la hemaglutinina y la neuroaminidasa bloquean la unión a los receptores celulares *in vitro* (Sección 26.8).

Las reacciones de neutralización también se usan *in vitro* en tests, en unos pocos laboratorios porque los tests de neutralización requieren sistemas biológicos.

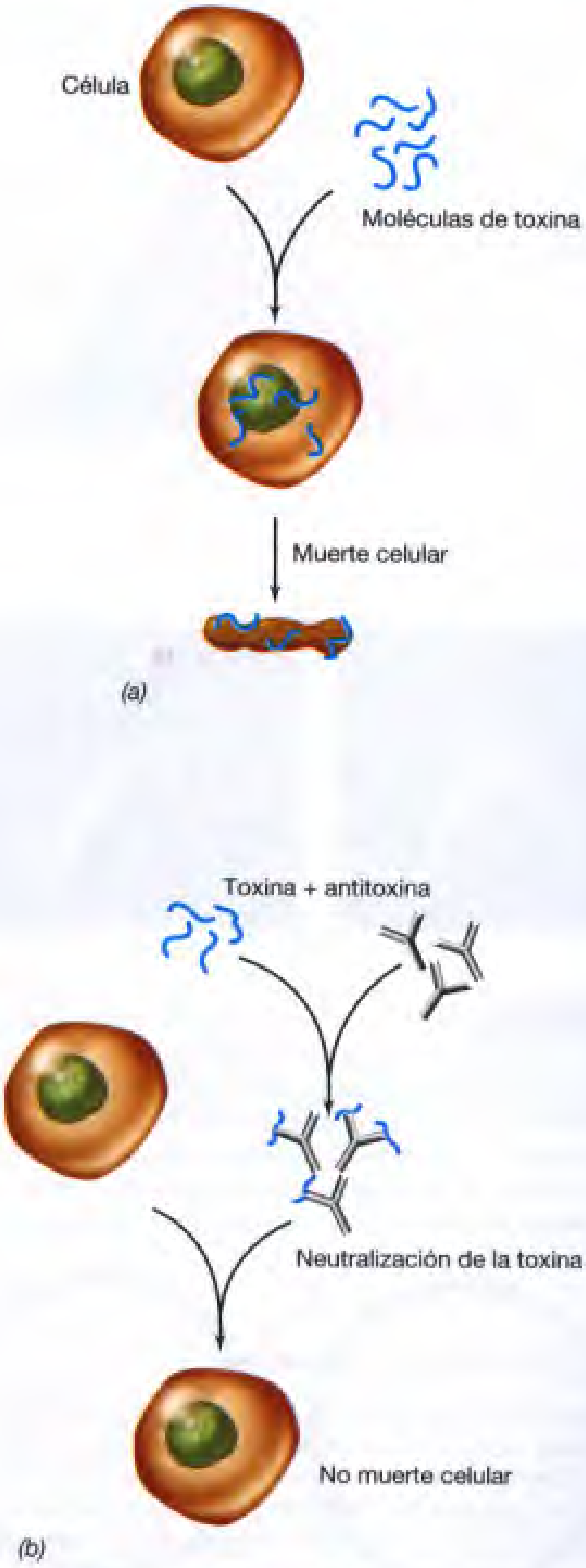


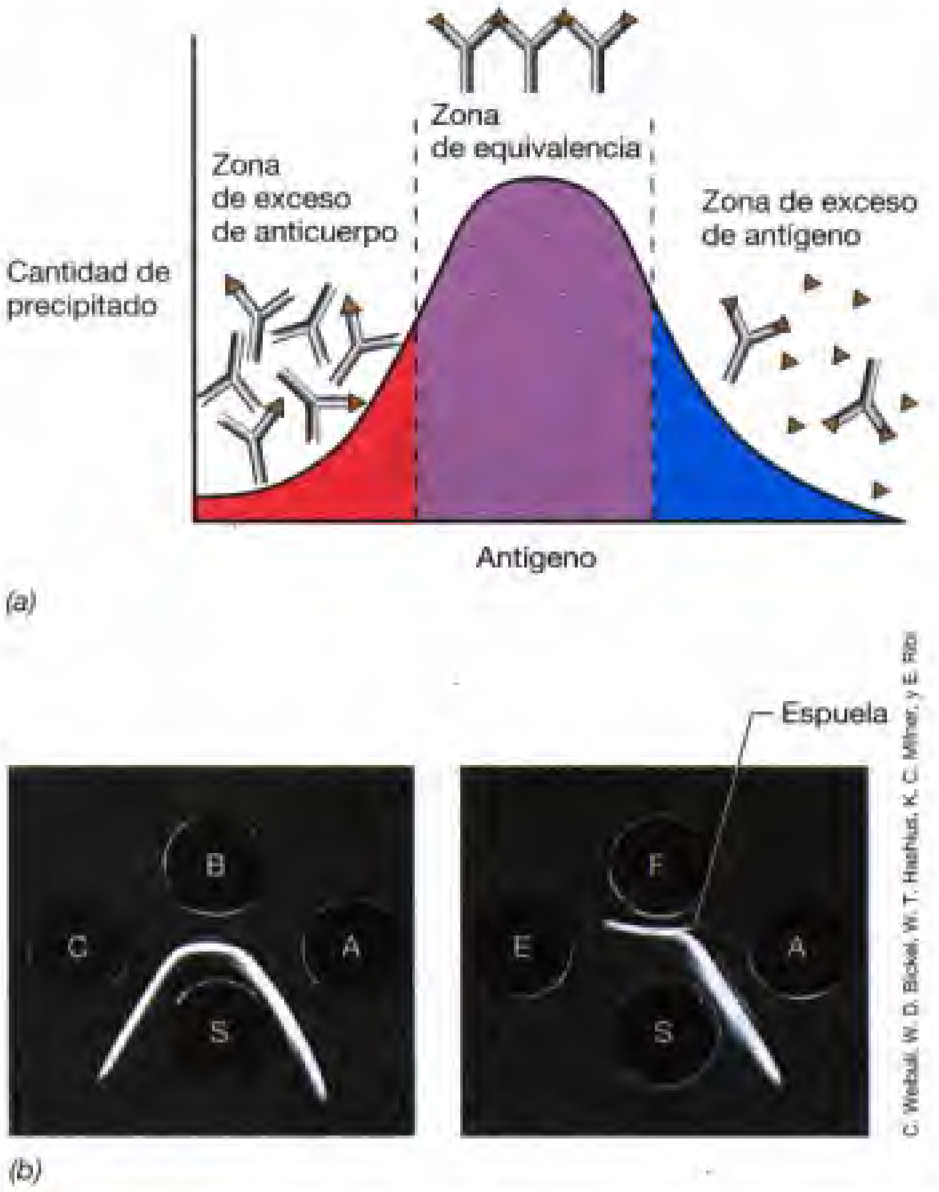
Figura 24.11 Neutralización de una toxina por anticuerpo. Las antitoxinas son utilizadas para los casos agudos de difteria (Sección 26.3), tetanos (Sección 27.8) y botulismo (Sección 29.5). La toxina sin tratar provoca la muerte celular. (b) La antitoxina neutraliza la toxina e impide la muerte celular.

Precipitación

La **precipitación** es la interacción de un antígeno soluble con un anticuerpo soluble para formar un precipitado insoluble. Los anticuerpos generalmente tienen dos sitios de unión al antígeno (son bivalentes) (Sección 22.8). Por lo tanto, es posible que un sitio se una con una molécula de antígeno diferente. Si el antígeno tiene más de un determinante disponible, el agregado se puede formar de varias moléculas de antígeno y anticuerpo (Figura 24.12*a*). Porque son bien vistas *in vitro*, las reacciones de precipitación son informativas en tests serológicos, especialmente para la medición cuantitativa de la concentracción de anticuerpos. La precipitación ocurre cuando se encuentran las dos substancias en concentracciones óptimas. La presencia excesiva de antígeno o anticuerpo da unos precipitados muy pequeños, también inmunocomplejos solubles.

Las precipitaciones en geles de agar, en el test de *inmunodifusión*, son usadas para estudiar la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo. Los dos, antígeno y anticuerpo, difunden del pocillo, y se forma un precipitado donde el antígeno y el anticuerpo están en concentracciones óptimas (Figura 24.12*b*). Las formas de las bandas de precipitación son características de las substancias cuando los dos pocillos del antígeno están próximos y junto al anticuerpo. Por ejemplo, si los dos antígenos están juntos en dos pocillos diferentes y si los antígenos son idénticos, formará una banda sencilla y fusionada de precipitación. Esto se denomina *identidad*. Por otro lado, si dos antígenos están en diferentes pocillos y uno contiene un antígeno diferente, eso formará una *identidad parcial* (Figura 24.12*b*). La línea de precipitación extendida (realizada por la precipitación del otro antígeno con el antisuero) es referida como una *espuela*. La inmunodifusión se utiliza como una herramienta bioquímica para acceder a proteínas obtenidas desde diferentes fuentes.

Desafortunadamente, las reacciones de precipitacción no son demasiado sensibles. Cantidades de microgramos de anticuerpo son necesarias para formar un precipitado (Tabla 24.8) y los tests diagnósticos requieren cantidades de nanogramos. Consecuentemente, las reacciones de precipitación son usadas en laboratorios de investigación y de referencia.



C. Weibull, W. D. Bickel, W. T. Haskins, K. C. Milner, y E. Ribi

Figura 24.12 Reacción de precipitacción frente a un antígeno soluble y un anticuerpo. La gráfica (a) muestra la extensión de la precipitación en función del antígeno y de la concentración de anticuerpo. (b) Precipitación en agar, un proceso llamado inmnudifusión. Los pocillos marcados con S contienen anticuerpos para células de *Proteus mirabilis*. Una línea de identidad es mostrada en la figura de la izquierda. En la derecha, el antígeno E no reacciona con el antígeno A, muestra identidad parcial con el antígeno F.

✓ 24.7 Revisión de conceptos

Las reacciones de antígeno con anticuerpo requieren que el anticuerpo se una con el antígeno. La especificidad y la sensibilidad definen los tests serológicos. La neutralización y la preciptación son ejemplos de tests que producen resultados visibles implicando interacciones entre antígeno y anticuerpo.

✓ Alta especificidad y alta sensibilidad en reacciones serológicas previenen falsos positivos y falsos negativos. Explíquelo.

✓ ¿Cuáles son las cantidades mínimas de antígeno y anticuerpo necesarias para una precipitación?

24.8 Aglutinación

La **aglutinación** se debe a la unión de un antígeno particulado con un anticuerpo. Mientras que no es tan sensible como otros tests serológicos, la aglutinación es 100 veces más sensible que la precipitación (Tabla 24.8). La aglutinación sigue siendo útil en el diagnóstico clínico al ser un inmunoanálisis barato, muy específico y rápido. Tests estandarizados de aglutinación son útiles, como en el caso de la conocida reacción para el tipaje del grupo sanguíneo ABO, y para la identificación de patógenos y de sus productos.

Aglutinación directa

La *aglutinación directa* ocurre cuando un anticuerpo soluble se encuentra con un antígeno que forma parte de una célula o de una particula insoluble. Quizás la más conocida de las aglutinaciones es la clasificación de glóbulos rojos de la sangre (eritrocitos). La aglutinación de los eritrocitos se conoce como *hemaglutinación* o también como *tipaje de la sangre*.

Los eritrocitos contienen un número variable de antígenos presentes en las células rojas. Los antígenos sanguíneos se llaman A, B y D (también conocido como Rh).

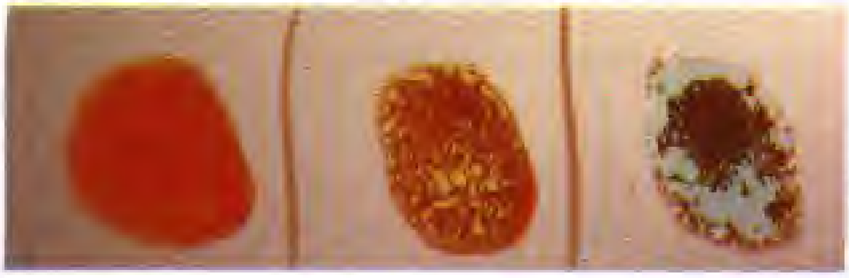
Los antígenos y anticuerpos A y B constituyen el sistema ABO. Se produce una aglutinación de los eritrocitos cuando se pone en presencia de un suero que reacciona con ellos bajo el microscopio (Figura 24.13). Los inmnunosueros se obtienen de pacientes que han sido inmnunizados para los antígenos A o B por recursos naturales o artificiales.

Para los grupos sanguíneos A, B y O, los individuos que expresan de forma codominante tienen los siguientes fenotipos: A, B, AB (un alelo expresa el antígeno A y el otro el B) u O (ausencia de antígenos A y B). De hecho un individuo promueve la formación de anticuerpos para los grupos que él no posee. Los del grupos A hacen anticuerpos frente al grupo B y los del grupo B hacen anticuerpos frente al A, los del grupo AB no tienen anticuerpos frente a ninguno y los de O tienen anticuerpos frente a A y B (Figura 24.13). Los anticuerpos contra A y B son llamados *anticuerpos naturales*, porque son generados por muchos individuos frente a la microbiota entérica. La prueba diagnóstica se realiza antes de una transfusion, para impedir la destrucción de la sangre.

Antes de una transfusión sanguínea se analiza el grupo sanguíneo, para evitar la destrucción de los eritrocitos. La destrucción de la sangre ocurriría si se encontraran anticuerpos frente a la sangre, y viceversa. Si seproduce la aglutinación pueden bloquearse las arterias o las venas y se puede producir una enferemedad seria, e incluso la muerte. Sin embargo, es más probable que los anticuerpos causen la *hemolisis*, la rotura de las células rojas, a través de la acción del complemento (Sección 22.10), resultando una severa anemia.

Aglutinación pasiva

La *aglutinación pasiva* se produce por anticuerpos solubles que se han unido a células o partículas de látex, o a partículas de carbón. El antígeno soluble o el anticuerpo se pueden detectar por reacciones de aglutinación. La célula o partícula se considera un soporte inerte. La aglutinación pasiva es 5 veces más sensible que la aglutinación activa (Tabla 24.8) e incrementa considerablemente la habilidad de detectar reactivos solubles.



Norman L. Morris

(a)

Tipo de sangre	Porcentaje de la población de Estados Unidos	Suero	
		Anti A	Anti B
Tipo O	47	No aglutinación	No aglutinación
Tipo A	42	Aglutinación	No aglutinación
Tipo B	8	No aglutinación	Aglutinación
Tipo AB	3	Aglutinación	Aglutinación

(b)

Figura 24.13 Aglutinación directa de células sanguíneas de la sangre para el tipaje de ABO. (a) La reacción de la izquierda muestra no aglutinación. La reacción del centro muestra aglutinación difusa, que indica reacción positiva con el grupo B. La reacción de la derecha indica aglutinación fuerte, típica del grupo A. (b) Tabla de los grupos sanguíneos esperados en la población de Estados Unidos.

La aglutinación de bolitas de látex recubiertas con anticuerpo o antígeno, con un anticuerpo complementario o un antígeno de un enfermo es un método característico de diagnóstico rápido. Para ello, en un porta para análisis microscópico, se mezcla el suero de un enfermo y bolitas recubiertas de látex (0,8 μm) con un antígeno o anticuerpo específico, y se incuba durante un corto periodo de tiempo. Si el suero del enfermo posee anticuerpo complementario de la molécula unida a la superficie de la bolita, la suspensión blanco lechosa de látex formará un agregado visible, indicativo de una reacción de aglutinación. La aglutinación del látex se usa para detectar antígenos de la superficie bacteriana mezclando una pequeña cantidad de una colonia bacteriana con bolitas de látex recubiertas de anticuerpo. Por ejemplo, existe una suspensión comercial de bolitas de látex que contiene anticuerpos frente a la proteína A y el factor de aglutinación, dos moléculas que se encuentran exclusivamente en la superficie de *Staphylococcus aureus*. Esta suspensión proporciona una seguridad del 100% prácticamente en la identificación de aislados clínicos de *S. aureus*. A diferencia de las pruebas clásicas para *S. aureus*, muchas de las cuales eran ensayos dependientes del crecimiento, la identificación de *S. aureus* mediante la prueba de las bolitas de látex requiere sólo 30 segundos (Figura 24.14). Se han desarrollado otras pruebas de aglutinación con bolitas de látex para identificar *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemphilus influenzae*, *Campylobacter* spp. y los hongos *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans*.

Una prueba de aglutinación con látex muy empleada es la que se utiliza para la detección de anticuerpos séricos específicos para el *factor reumatoide*, un anticuerpo dirigido contra las propias inmunoglobulinas del organismo y que se asocia con la enfermedad autoinmune *artritis reumatoide* (Sección 22.13). Se mezclan bolitas de látex recubiertas de inmunoglobulina humana con sangre completa o suero, y se evalúa la aglutinación frente a sueros de control positivos y negativos que se realizan en paralelo.

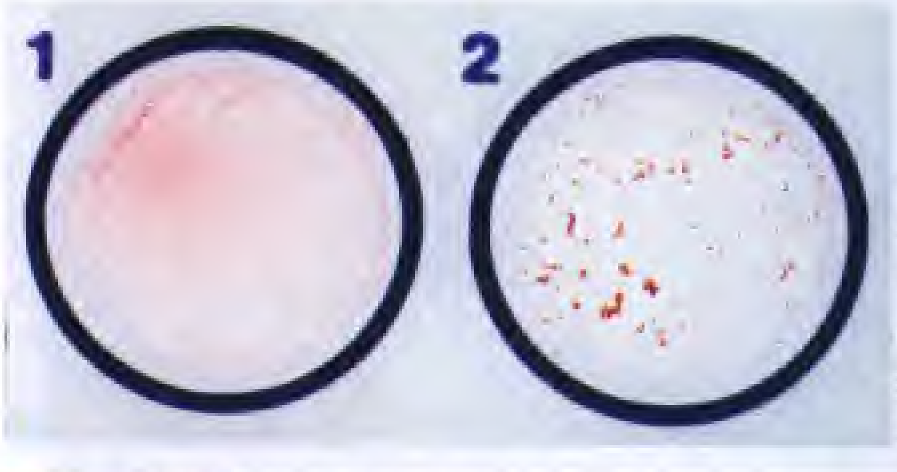
Las pruebas con bolitas de látex (aglutinación pasiva) son sencillas y específicas. Además, son pruebas baratas, lo que las hace adecuadas para el rastreo a gran escala; el uso generalizado de la prueba reumatoide es un buen ejemplo de esto. Al no requerir un equipo costoso o un entrenamiento especial, su uso está muy generalizado en todas las instituciones clínicas.

✓ 24.8 Revisión de conceptos

La pruebas de aglutinación directa se utilizan para la determinación de los grupos sanguíneos. Las pruebas de aglutinación pasiva, para la identificación de varios patógenos y de sus productos. Las pruebas de aglutinación constituyen métodos rápidos, relativamente sensibles y baratos

✓ Distinga entre aglutinación *directa* y *pasiva*. ¿Qué pruebas son más sensibles?

✓ ¿Qué ventajas presentan las pruebas de aglutinación sobre otros inmunoensayos?, ¿cuáles son los inconvenientes?



John Martinko y Cheryl Broadie

Figura 24.14 Prueba de aglutinación con bolitas de látex para *Staphylococcus aureus*. El panel 1 muestra un control negativo. Obsérvese el color rosa uniforme de las bolitas de látex suspendidas que están recubiertas de anticuerpos contra la proteína A y el factor de aglutinación, dos antígenos que son exclusivos de la superficie de las células de *S. aureus*. En el panel 2 puede verse la misma suspensión después de que el material se haya removido con el asa a partir de la mezcla con la suspensión de una colonia bacteriana. Los grumos rojo brillante indican una reacción de aglutinación positiva específica de la colonia de *S. aureus*.

24.9 Microscopía inmunoelectrónica

En microscopía electrónica se pueden utilizar anticuerpos conjugados químicamente con metales pesados para localizar antígenos en las células. Esto es factible porque los metales pesados desvían el rayo de electrones en el microscopio electrónico. Esta técnica denominada *microscopía inmunoelectrónica* se utiliza fundamentalmente en investigación, debido a la necesidad de determinar la localización de un antígeno específico (generalmente una proteína) en una región concreta de la célula (Figura 24.15). Después de la fijación química y otros preparativos necesarios para la observación en microscopio electrónico, las células se ponen en contacto con anticuerpos conjugados covalentemente con un metal pesado, generalmente oro o platino. Los metales electro-densos difractan los electrones, por lo que puede detectarse la presencia de anticuerpo unido en forma de manchas densas negras en las fotografías de la preparación.

En microscopía inmunoelectrónica, aunque la célula está muerta y fijada químicamente, la mayoría de los antígenos proteicos conservan su estructura nativa y los anticuerpos todavía son capaces de reaccionar con pequeñas reacciones cruzadas inespecíficas. La microscopía inmunoelectrónica se ha utilizado ampliamente para determinar con precisión la localización de las enzimas en las células, especialmente cuando se sospecha su asociación a la membrana citoplasmática o a otra estructura interna (Figura 24.15).

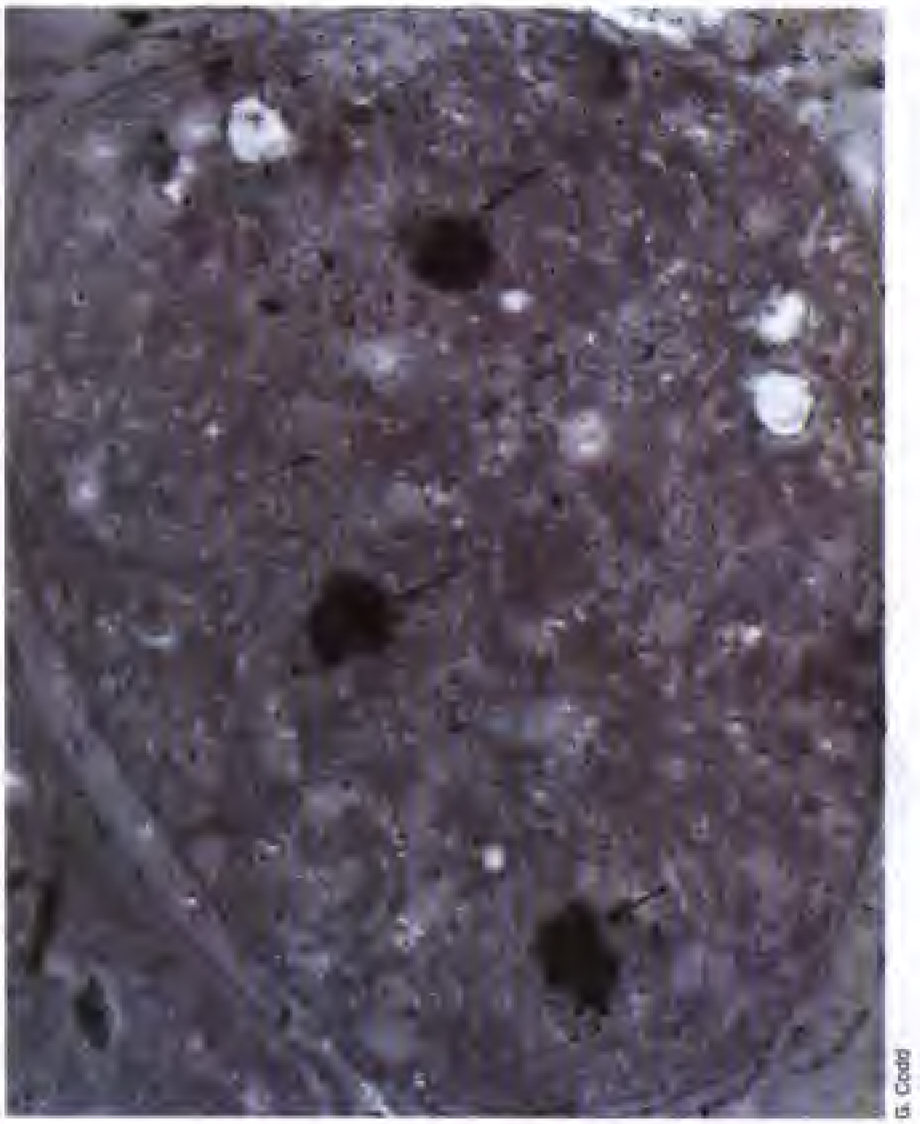

G. Codd

Figura 24.15 Microscopía inmunoelectrónica. Se añaden anticuerpos de conejo contra la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa de la cianobacteria *Chlorogloeopsis fritschii* a secciones finas de *C. fritschii* y se trata la preparación con IgG de carnero anticonejo conjugada con partículas de oro coloidal de 20 nm. La concentración de las partículas alrededor de las inclusiones grandes, denominadas carboxisomas (flechas), indica que la enzima abunda en esta localización.

Si bien se puede recurrir a la microscopía inmunoelectrónica para identificar patógenos como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en las células (Figura 26.35), una serie de circunstancias como el tiempo, el coste económico, la experiencia y el equipo especializado que se necesita, la hacen poco práctica como técnica diagnóstica, si no en todos, en la mayoría de los centros de investigación clínica especializada.

✓ 24.9 Revisión de conceptos

La microscopía inmunoelectrónica es una herramienta de investigación que se utiliza para localizar los antígenos en las células.

- ✓ ¿Por qué se emplean los conjugados anticuerpo-metal pesado en microscopía inmunoelectrónica?

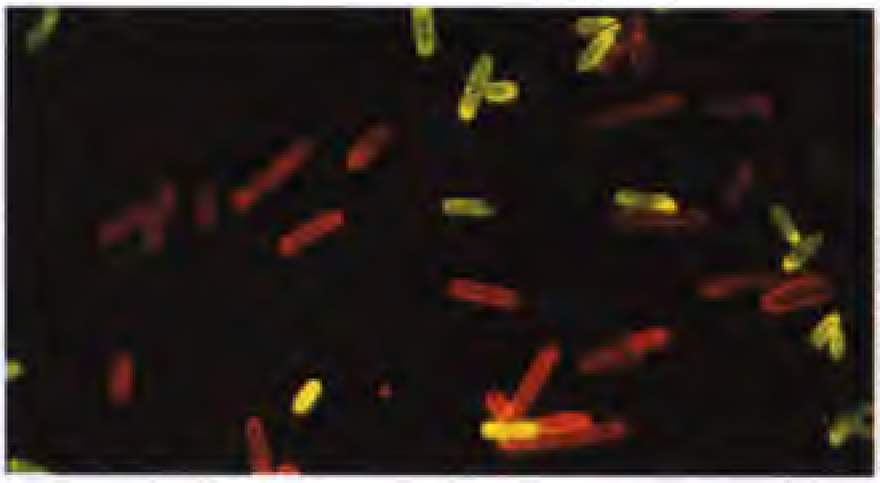
24.10 Anticuerpos fluorescentes

En esta sección expondremos el uso de anticuerpos químicamente modificados con colorantes fluorescentes. Esta técnica posibilita la detección de reacciones de anticuerpos con células individuales. Prácticamente cualquier laboratorio bien equipado utiliza con profusión los **anticuerpos fluorescentes** en las técnicas de diagnóstico clínico y aplicaciones de investigación.

Métodos fluorescentes

Los anticuerpos pueden hacerse fluorescentes si se les une covalentemente compuestos orgánicos fluorescentes como rodamina B de fluorescencia roja, o isotiocianato de fluorescencia que da una fluorescencia amarilla verdosa. Esto no altera la especificidad del anticuerpo, pero permite la detección del mismo unido a la célula o los antígenos de la superficie tisular usando el microscopio de fluorescencia (Figura 24.16). Las células a las que se unen los anticuerpos fluorescentes emiten un color fluorescente brillante, generalmente rojo o amarillo verdoso, según el colorante utilizado. Los anticuerpos fluorescentes han sido de considerable utilidad en microbiología diagnóstica, al permitir el estudio de los microorganismos en el especimen del paciente (*in situ*) y evitan el aislamiento y cultivo del organismo (*véase* más adelante). La técnica de los anticuerpos fluorescentes también es muy útil en ecología microbiana, donde representa uno de los pocos métodos que existen para la identificación directa de células microbianas en ambientes naturales, sin necesidad de aislarlas o cultivarlas.

Se utilizan dos técnicas de tinción de anticuerpos fluorescentes distintas, la *directa* y la *indirecta*. En el método directo, es el propio anticuerpo contra el microorganismo el que es fluorescente. En el método indirecto, la presencia de un anticuerpo no fluorescente sobre la superficie de la célula se detecta mediante un anticuerpo fluorescente dirigido contra el anticuerpo no fluorescente (Figura 24.17). Esto se con-



Wellcome Research Laboratories

Figura 24.16 Reacciones de anticuerpos fluorescentes. Se tratan células de *Clostridium septicum* con un anticuerpo conjugado con isotiocianato de fluoresceína que da una fluorescencia verde amarillenta. Las células de *Clostridium chauvei* se tiñen con un anticuerpo conjugado con rodamina B, que da una fluorescencia rojo-naranja.

sigue inmunizando una especie animal, por ejemplo una cabra, con anticuerpos obtenidos en una segunda especie, por ejemplo un conejo, conjugando a continuación el colorante fluorescente con los anticuerpos de carnero. Los anticuerpos de cabra anticonejo fluorescentes pueden entonces utilizarse para detectar la presencia de inmunoglobulinas de conejo que previamente se hayan unido a las células.

Aplicaciones clínicas

La prueba clínica de anticuerpos fluorescentes consiste en colocar sobre un porta que contiene el patógeno sospechoso, el anticuerpo fluorescente específico. El resultado de la reacción se observa con el microscopio de fluorescencia. Si el patógeno contiene antígenos de superficie frente a los que se ha preparado un antisuero fluorescente (es decir, el patógeno sospechoso es idéntico, o inmunológicamente está muy relacionado con las células que se emplearon para fabricar los anticuerpos), las células emitirán fluorescencia (Figura 24.18).

Los anticuerpos fluorescentes se pueden aplicar también directamente sobre los tejidos infectados del hospedador, permitiendo hacer un diagnóstico del patógeno sospechoso mucho antes que las técnicas de aislamiento primario. Por ejemplo, en el diagnóstico de legionelosis (Sección 28.7) puede hacerse un diagnóstico positivo mediante tinción de una biopsia de tejido pulmonar con anticuerpos fluorescentes preparados contra las paredes celulares de *Legionella pneumophila*, el agente etiológico de la legionelosis (Figura 24.18*a*). Análogamente, se puede utilizar un anticuerpo fluorescente contra la cápsula de *Bacillus anthracis* en el diagnóstico microscópico del carbunco. Las reacciones de un anticuerpo fluorescente pueden utilizarse igualmente en el diagnóstico de infecciones víricas (Figura 24.18*b*) y varias enfermedades no infecciosas. Por ejemplo, en la identificación de tipos celulares que expresan un antígeno concreto, como las células neoplásicas, los anticuerpos fluorescentes pueden ser muy valiosos en el seguimiento del curso de la enfermedad (Figura 24.19).

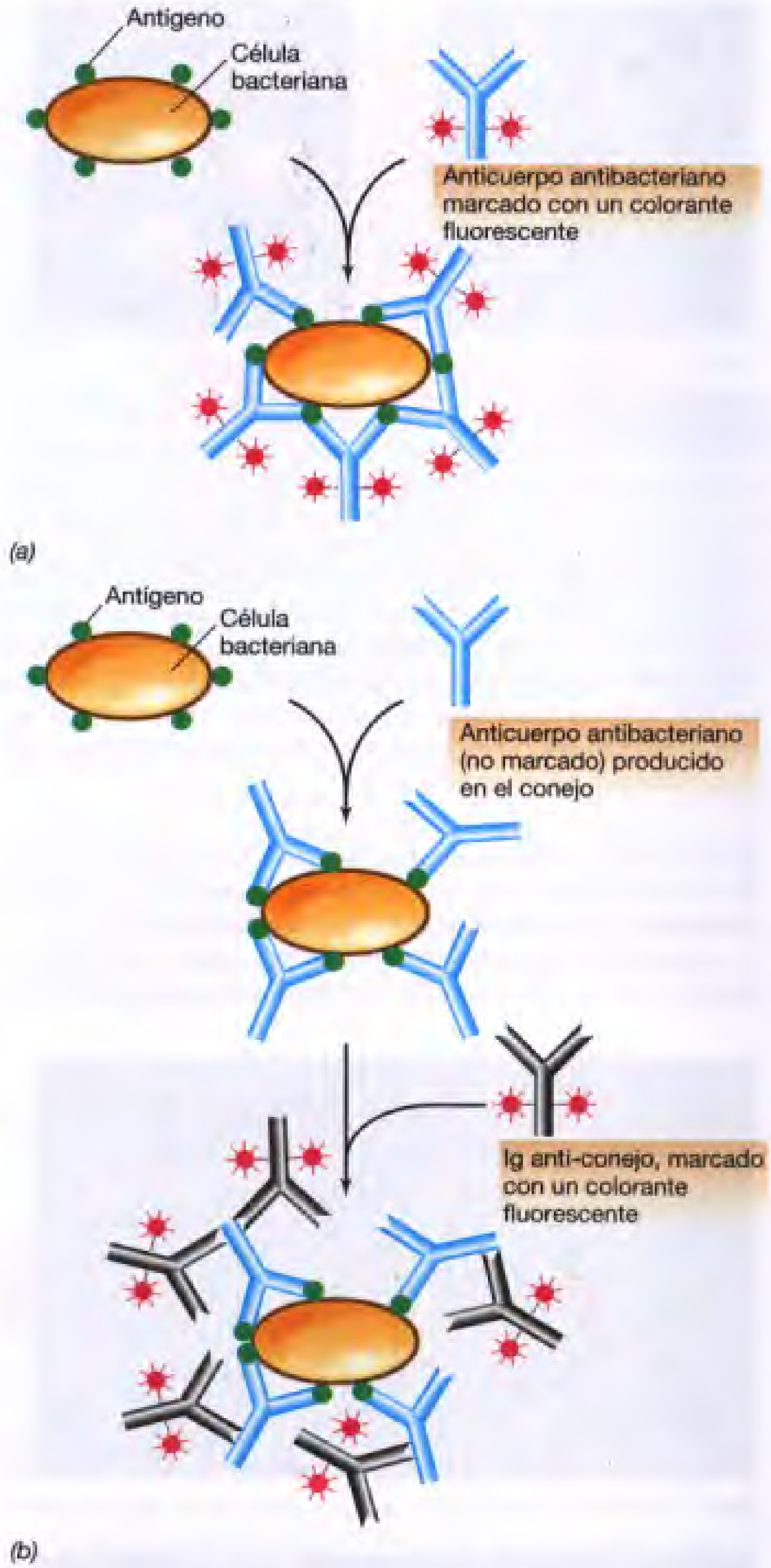
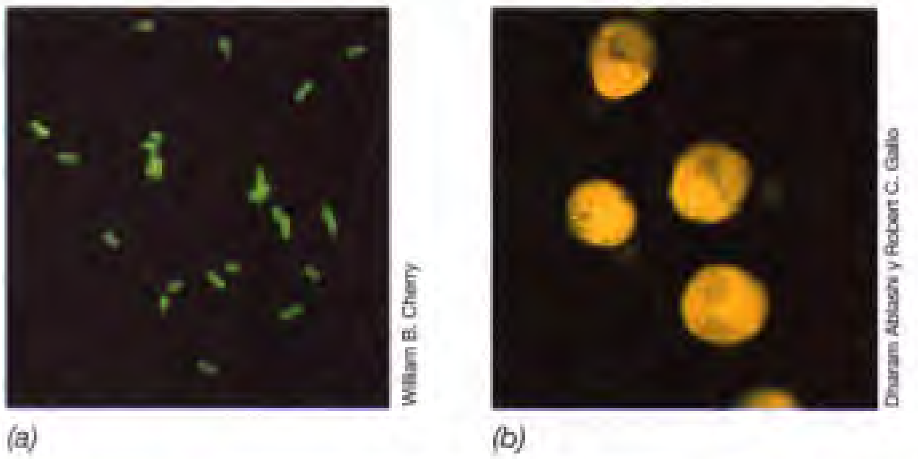

Antigeno
Célula bacteriana
Anticuerpo antibacteriano marcado con un colorante fluorescente
(a)
Antígeno
Célula bacteriana
Anticuerpo antibacteriano (no marcado) producido en el conejo
Ig anti-conejo, marcado con un colorante fluorescente
(b)

Figura 24.17 Métodos de utilización de anticuerpos fluorescentes para detectar antígenos de la superficie bacteriana. (a) Método de tinción directa. (b). Método de tinción indirecta.

Los anticuerpos fluorescentes también pueden usarse para separar mezclas de células en poblaciones relativamente puras, o para definir los recuentos de ciertos tipos celulares en mezclas complejas como la sangre. Los anticuerpos monoclonales fluorescentes dirigidos contra los antígenos de superficie CD4 y CD8 de los linfocitos T (Sección 22.5), se utilizan rutinariamente para el recuento de estas células en la población de leucocitos de la sangre (Figura 24.20). Por ejemplo, la definción de síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) conlleva una disminución de células CD4. Además, el CD4 se modifica durante la progresión del SIDA. Por tanto, la definición del recuento de CD4 permite al clínico


(a) (b)

William B. Cherry

Dharam Ablashi y Robert C. Gallo

Figura 24.18 Ejemplos del empleo de anticuerpos fluorescentes en microbiología clínica. (a) Tinción inmunofluorescente de células de *Legionella pneumophila* causante de la legionelosis. Los organismos tienen una longitud de 2-5 µm. (b) Detección de células infectadas por virus mediante inmunofluorescencia. Células de bazo infectadas por el virus linfotropo B humano (HBLV) se incuban con un suero que contiene anticuerpos contra HBLV de un enfermo con un trastorno linfoproliferativo. Después, las células se tratan con anticuerpos anti-IgG humana conjugados con isotiocianato de fluoresceína. Las células infectadas con HBLV dan una fluorescencia amarillo brillante. Las células que forman el fondo no reaccionan con el suero del enfermo. Las células tienen un diámetro aproximado de 10 µm.

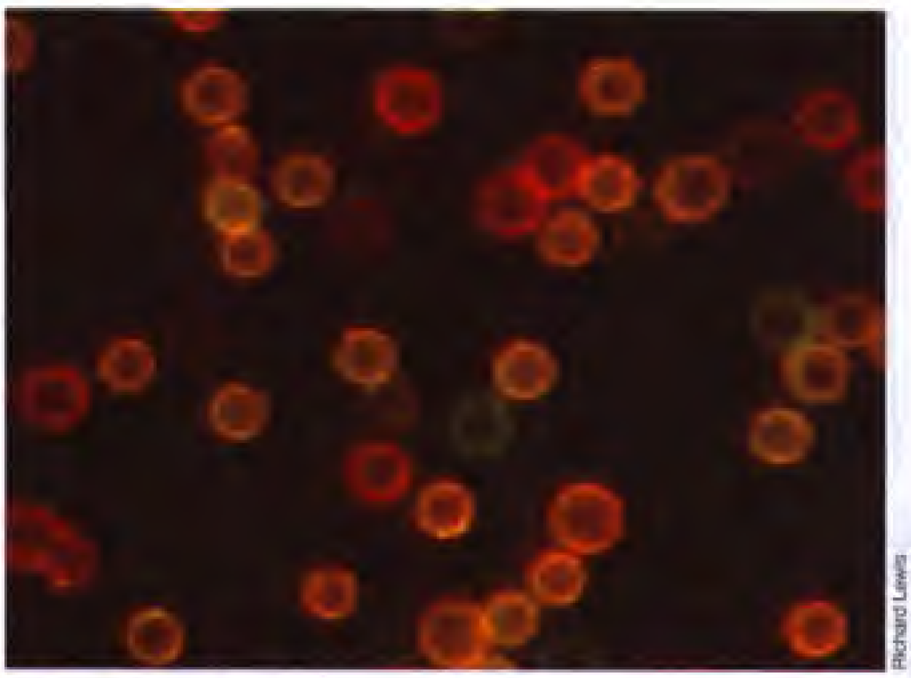

Richard Lewis

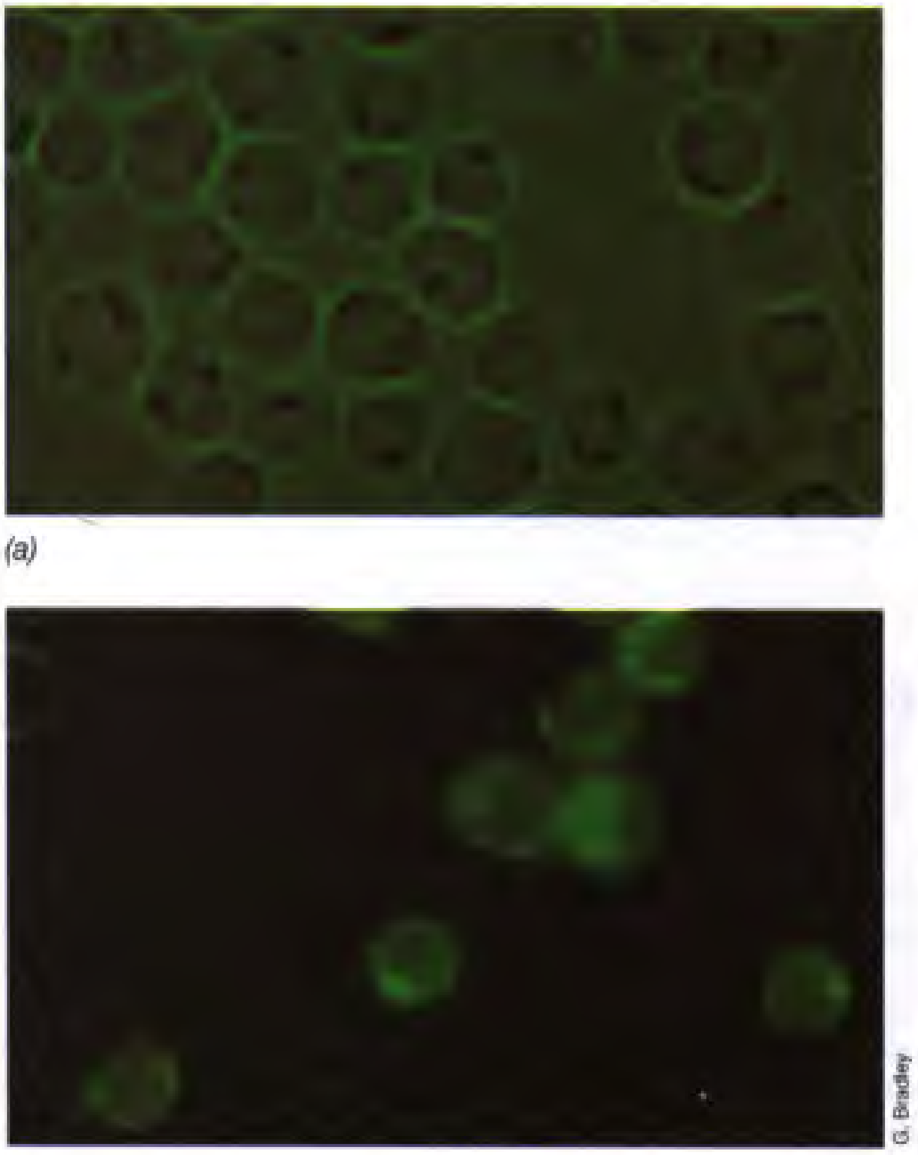
Figura 24.20 Linfocitos T teñidos con anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína, específicos de los marcadores de superficie. Las células verde amarillentas son células T citotóxicas (CD8); las células rojas son células T colaboradoras (CD4). Las células de diferente clon pueden separarse mediante citometría de flujo, para dar lugar a poblaciones enriquecidas de distintos tipos celulares. Reproducido con permiso de *Science 239*: Cubierta (12 feb., 1988), ©AAAS.

identificar la disminución de células CD4 y, mediante sucesivos análisis a lo largo del tiempo, puede hacer un seguimiento del progreso de la enfermedad (Sección 26.14).

Las células fluorescentes se pueden visualizar, contar y separar con un instrumento denominado *espectrómetro de fluorescencia*, también llamado clasificador celular activado por fluorescencia (FACS). El FACS utiliza un rayo láser para activar las moléculas fluorescentes (en este caso, el anticuerpo fluorescente unido a las células), colocando una carga sobre las células marcadas. Tras la exposición al láser, se aplica un campo eléctrico a la mezcla celular. Después, las células fluorescentes y no fluorescentes son desviadas hacia los extremos opuestos del campo eléctrico, donde cada población celular se cuenta y se deposita en un tubo. La utilización de varios anticuerpos, cada uno marcado con un fluorocromo distinto, puede dar lugar a la identificación simultánea de varios marcadores celulares. En la Figura 24.21 se muestra una aplicación típica para la identificación de células T CD3 y CD4 positivas en pacientes normales y en enfermos de SIDA.

El análisis por FACS resulta útil con fines de investigación. Por ejemplo, los inmunólogos usan rutinariamente las técnicas del FACS para separar mezclas complejas de células inmunes. Después, pueden estudiar las propiedades de las poblaciones de células muy enriquecidas.

En condiciones adecuadas, los anticuerpos fluorescentes proporcionan una información rápida, muy específica y útil sobre distintos cuadros clínicos. Sin embargo, la utilización inmunodiagnóstica de las técnicas de anticuerpos


(a)

G. Bradley

Figura 24.19 Utilización de anticuerpos fluorescentes en el diagnóstico de enfermedades no infecciosas. (a) Células humanas de la leucemia, algunas de las cuales son sensibles a un fármaco anticanceroso tóxico y otras no, siendo indistinguibles. (b) Cuando se tratan las células de (a) con un anticuerpo monoclonal fluorescente que se une específicamente a una proteína que sólo se expresa en la superficie de las células resistentes al fármaco, éstas emiten fluorescencia a diferencia de las que son sensibles al fármaco. Las células individuales son del tamaño de 10 a 12 µm de diámetro.

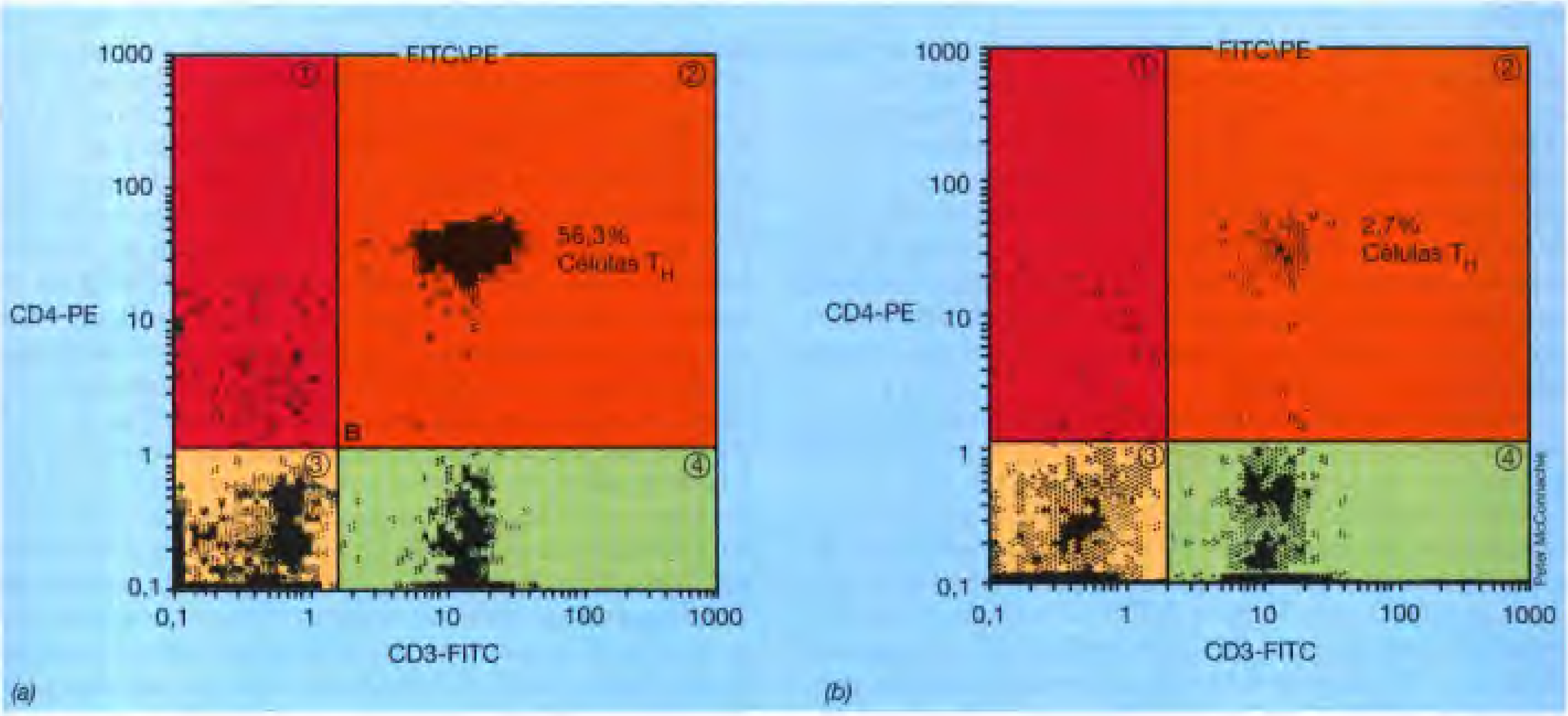


Figura 24.21 Recuento de células CD3 y CD4 de un hombre sano (a) y de un hombre con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), (b) utilizando un citómetro de flujo (FACS). Cada punto representa una única célula. Simultáneamente se marcaron células de sangre periférica con un anticuerpo monoclonal anti-CD4 conjugado a ficoeritrina (FE) y con un anticuerpo monoclonal anti-CD3 conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC). CD3 se expresa en todas las células T. CD4 se expresa sólo en células T colaboradoras (T_H). El cuadrante 3 muestra células sin teñir. El cuadrante 1 muestra células teñidas únicamente con anti-CD4. El cuadrante 4 muestra células teñidas sólo con anti-CD3. El cuadrante 2 muestra células teñidas con anti-CD3 y anti-CD4. (a) Resultados del hombre sano. En este caso, 56,3% de las células son T_H. (b) Resultados de un enfermo con SIDA clínico. En este caso, solamente el 2,7% del total de células T eran células T_H, como indica el patrón de tinción muy ligera del cuadrante 2. (datos originales cedidos por Peter McConnachie, usados con el permiso de él.)

fluorescentes no está exenta de dificultades. Hay que tener en cuenta que la tinción inespecífica puede representar un problema, ya que los antígenos de superficie pueden dar reacción cruzada entre distintas especies bacterianas, algunas de las cuales pueden ser miembros de la microbiota normal. Esto constituye un problema importante en el caso de las enterobacterias en las que, frecuentemente, los antígenos derivados de los lipopolisacáridos son lo suficientemente parecidos entre las especies (Sección 4.9), como pra unirse total o parcialmente a la sonda fluorescente. De ahí que el microbiólogo clínico deba poner especial cuidado en la realización de controles utilizando sueros inespecíficos y confirmando todos los hallazgos de inmunofluorescencia positiva recurriendo a otras pruebas inmunológicas o microbiológicas.

✓ 24.10 Revisión de conceptos

Los anticuerpos fluorescentes pueden emplearse para la identificación rápida y precisa de patógenos y otras moléculas antigénicas en muestras de tejidos y en otros ambientes complejos. Recurriendo a la separación mediante citometría de flujo, los anticuerpos fluorescentes se pueden utilizar para el recuento cuantitativo de varios tipos de célula.

✓ ¿Los anticuerpos fluorescentes son más sensibles a la detección de células individuales en una muestra compleja de células como un tejido?

✓ ¿De qué manera se emplean los anticuerpos fluorescentes para identificar células específicas en mezclas complejas como la sangre?

24.11 Enzimoinmunoanálisis y radioinmunoanálisis

La especificidad de los anticuerpos es tal que el factor limitante, en la mayoría de las reacciones inmunológicas expuestas hasta el momento, no es la *especificidad* sino la *sensibilidad* (*véase* Sección 24.5 y Tabla 24.6). Dos de las técnicas inmunológicas más usadas, dada su exquisita especificidad, son el radioinmunoanálisis (RIA) y el enzimoinmunoanálisis (ELISA). Estos métodos emplean isótopos radiactivos y enzimas, respectivamente, para detectar moléculas de anticuerpo. Teniendo en cuenta que la radiactividad y los productos de ciertas reacciones enzimáticas pueden medirse en cantidades muy pequeñas, la unión del ligando radiactivo o del enzima al anticuerpo produce una disminución de la cantidad del complejo antígeno-anticuerpo que se necesita para detectar una reacción. Este aumento de la sensibilidad ha resultado muy útil en el diagnóstico clínico y en la investigación, y ha abierto la puerta al desarrollo de nuevas pruebas inmunológicas (*véase* recuadros, «Test de orina para detectar el abuso de drogas» y «Kits de inmunodiagnóstico a la venta»).

ELISA

La unión covalente de las enzimas a los anticuerpos da lugar a una herramienta inmunológica que posee a la vez una alta especificidad y sensibilidad. La técnica denominada **ELISA** (del inglés *e*nzyme-*l*inked *i*mmuno-*s*orbent *a*ssay) utiliza anticuerpos que se unen covalentemente a las enzimas; de este modo se conservan las propiedades catalíticas de las enzimas y la especificidad de los anticuerpos. Las enzimas de unión típicas utilizadas incluyen peroxidasa, fosfatasa alcalina y β-galactosidasa, que catalizan reacciones cuyos productos son coloreados y pueden medirse en cantidades muy pequeñas.

Se han desarrollado dos metodologías de ELISA, una para la detección del antígeno (ELISA *directo*) y otra para la detección de anticuerpos (ELISA *indirecto*). Para la detección de antígenos, como partículas víricas, a partir de la sangre o de una muestra de heces, se utiliza el ELISA directo. En esta técnica, el antígeno es «atrapado» entre dos capas de anticuerpos (Figura 24.22), de ahí que a veces se denomine a este método (*ELISA en sándwich*). La muestra se añade a los pocillos de una placa de microtitulación previamente recubierta con anticuerpos específicos para el antígeno que quiere detectarse. Si el antígeno (partícula vírica) se halla presente en la muestra, quedará atrapado en los sitios de unión al antígeno de los anticuerpos. Después de eliminar mediante lavado el material no unido, se añade un segundo anticuerpo con la enzima conjugada. Este segundo anticuerpo también es específico para el antígeno, de tal forma que se une a cualquiera de los determinantes restantes expuestos. Después del lavado, la actividad de la enzima del material unido en cada pocillo de microtitulación se determina añadiendo el sustrato de la enzima. El color que se forma es proporcional a la cantidad de antígeno presente (Figura 24.22).

El ELISA indirecto se utiliza para detectar *anticuerpos* en el suero humano. La prueba del ELISA indirecto se usa habitualmente para la detección de anticuerpos frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); vamos a exponer esta prueba con cierto detalle, pues los principios en que se basa se aplican a todas las pruebas del ELISA indirecto.

EL ELISA-VIH

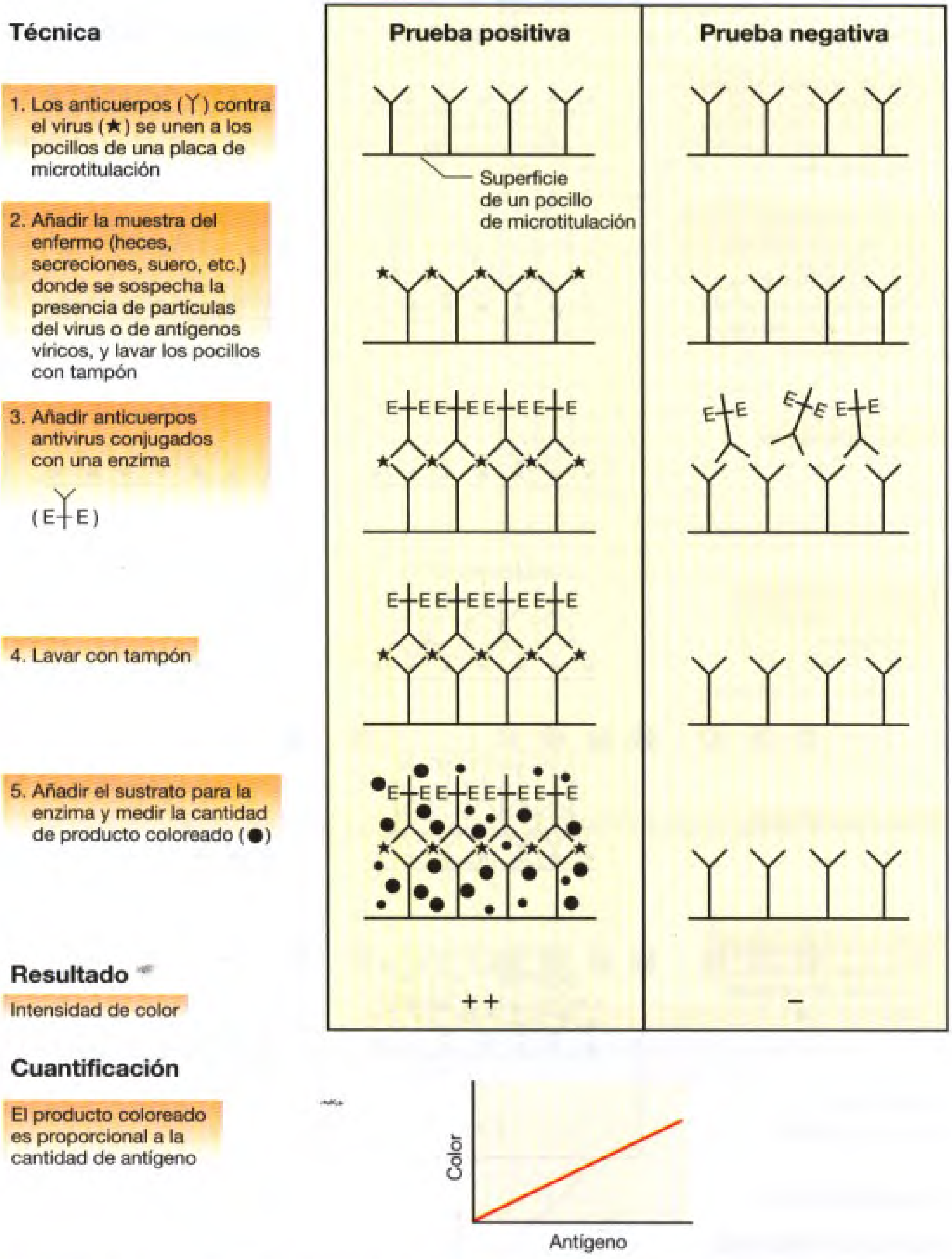
El agente etiológico del SIDA, el *virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)* (Sección 26.14), se transmite a través de líquidos corporales como la sangre. Para el rastreo se necesitan herramientas que sean rápidas, eficaces y económicas con el fin de analizar muestras de sangre para cerciorarse de que el VIH no se ha transmitido inadvertidamente durante las transfusiones de sangre o a través de los productos sanguíneos. La prueba de ELISA se utiliza para el despistaje de rutina de la sangre cuando existen signos de exposición al VIH (y por tanto, de un posible SIDA).

La prueba ELISA-VIH es un ELISA *indirecto* diseñado para cuantificar *anticuerpos* frente al VIH presente en el suero. La infección inicial por el VIH lleva a la producción de anticuerpos contra varios antígenos del VIH, concretamente frente a antígenos de la envoltura. Estos anticuerpos pueden detectarse mediante la prueba del ELISA-VIH (Figura 24.23).

La realización de la prueba del ELISA-VIH implica en primer lugar el recubrimiento de las placas de microtitulación con una preparación disgregada de partículas de VIH; cada pocillo requiere aproximadamente unos 200 ng de VIH disgregado. Después de una breve incubación para asegurar la unión de los antígenos a la superficie de los pocillos de microtitulación, se añade una muestra de suero diluido y la mezcla se incuba para permitir la unión de anticuerpos específicos para VIH con antígenos de VIH. Para detectar la presencia de complejos antígeno-anticuerpo, se añade a continuación un segundo anticuerpo. Este segundo anticuerpo es una preparación de inmunoglobulina humana anti-IgG conjugada con una enzima. Tras un breve periodo de incubación con el segundo anticuerpo y una fase de lavado para eliminar completamente el segundo anticuerpo sin unir, se valora la actividad de la enzima (los anticuerpos humanos anti-IgG se unen a los anticuerpos IgG específicos de VIH, que están unidos a la preparación de antígenos de VIH). El color del ensayo enzimático es proporcional a la cantidad de anticuerpo humano anti-IgG unido (Figura 24.23). La unión del segundo anticuerpo indica que los anticuerpos del suero del enfermo reconocen a los antígenos del VIH, que el enfermo posee anticuerpos frente al VIH y que ha estado expuesto al mismo. En paralelo se analizan las muestras con sueros de control (negativos para VIH) con el objeto de medir la intensidad de la absorbancia de fondo en la prueba.

La prueba del ELISA-VIH es un método rápido, muy sensible y específico para detectar la exposición al VIH. Puesto que en general los ELISAs se adaptan muy bien al rastreo en masa y a la automatización, la prueba del ELISA-VIH se utiliza como método estándar de rastreo de la sangre. Sin embargo, este método de análisis puede arrojar resultados erróneos en ciertas circunstancias. Por ejemplo, la prueba da a veces falsos positivos. Diversos factores pueden contribuir a los resultados finales, lo que podría explicar la falta de relación con la exposición al VIH. De ahí que todas las pruebas del ELISA-VIH *deban* ser confirmadas mediante otra prueba independiente, generalmente por un análisis de Westernblot (inmunoblot o inmunotransferencia) (*véase* Sección 24.12). Una prueba de Westernblot para VIH positiva después de una prueba ELISA-VIH positiva se considera indicativo de infección por VIH.

La prueba del ELISA-VIH presenta un inconveniente final y es la posibilidad de obtener resultados falsos negativos. En la Sección 24.5, aprendimos que el sistema inmune tarda un tiempo en desarrollar una respuesta humoral eficaz con un título detectable de anticuerpos. En el caso de la infección por VIH, se estima que este periodo de latencia es de 6 semanas a un año. Por tanto, los individuos que se han infectado recientemente con el VIH, cuando se analicen, es posible que todavía no hayan producido cantidades detectables de anticuerpo. Los resultados falsos negativos en el ELISA-VIH pueden obedecer a otra razón, la destrucción del sistema inmune en los casos avanzados de SIDA; la ausencia de células inmunes impide la fabricación de anticuerpos y hace inútil la prueba del ELISA; sin embargo, en este estadio de la enfermedad es posible un diagnóstico clínico basado en la información clínica (*véase* Sección 26.14) y el ELISA resulta útil sólo como un indicador de confirmación.


Técnica

1. Los anticuerpos (Y) contra el virus (★) se unen a los pocillos de una placa de microtitulación
2. Añadir la muestra del enfermo (heces, secreciones, suero, etc.) donde se sospecha la presencia de partículas del virus o de antígenos víricos, y lavar los pocillos con tampón
3. Añadir anticuerpos antivirus conjugados con una enzima (E‑Y‑E)
4. Lavar con tampón
5. Añadir el sustrato para la enzima y medir la cantidad de producto coloreado (●)

Resultado

Intensidad de color

Cuantificación

El producto coloreado es proporcional a la cantidad de antígeno

Figura 24.22 Detección de virus mediante una prueba del ELISA directo.

Otras pruebas del ELISA de importancia clínica Además de la prueba del ELISA para el VIH, se han desarrollado literalmente cientos de ELISAs de utilidad clínica. Algunos de estos ELISAs son directos y su finalidad es la detección de antígenos. Se han desarrollado ELISAs directos para la detección de toxinas bacterianas como la toxina del cólera, la toxina de *Escherichia coli* enteropatógena y la enterotoxina de *Staphylococcus aureus*. Los virus que se detectan en la actualidad mediante técnicas de ELISA directo incluyen rotavirus, virus de la hepatitis, virus de la rubeola, bunyavirus, virus del sarampión y la parotiditis, y virus parainfluenza.

Se han desarrollado ELISAs indirectos para la detección de anticuerpos frente a distintas bacterias de importancia clínica. Sin dar una lista exhaustiva, se han desarrollado ELISAs para la detección de anticuerpos séricos frente a

Técnica

1. Recubrir los pocillos de microtitulación con la preparación del antígeno a partir de partículas del VIH rotas (★)
2. Añadir la muestra del suero del enfermo. Los anticuerpos específicos del VIH se unen al antígeno del VIH; los otros anticuerpos no se unen
3. Lavar con tampón
4. Añadir anticuerpos anti-IgG humana conjugados a la enzima (E⊥E)
5. Lavar con tampón
6. Añadir el sustrato para la enzima y medir la cantidad de producto coloreado (●)

Resultado

Intensidad de color

Cuantificación

El producto coloreado es proporcional a la cantidad de antígeno

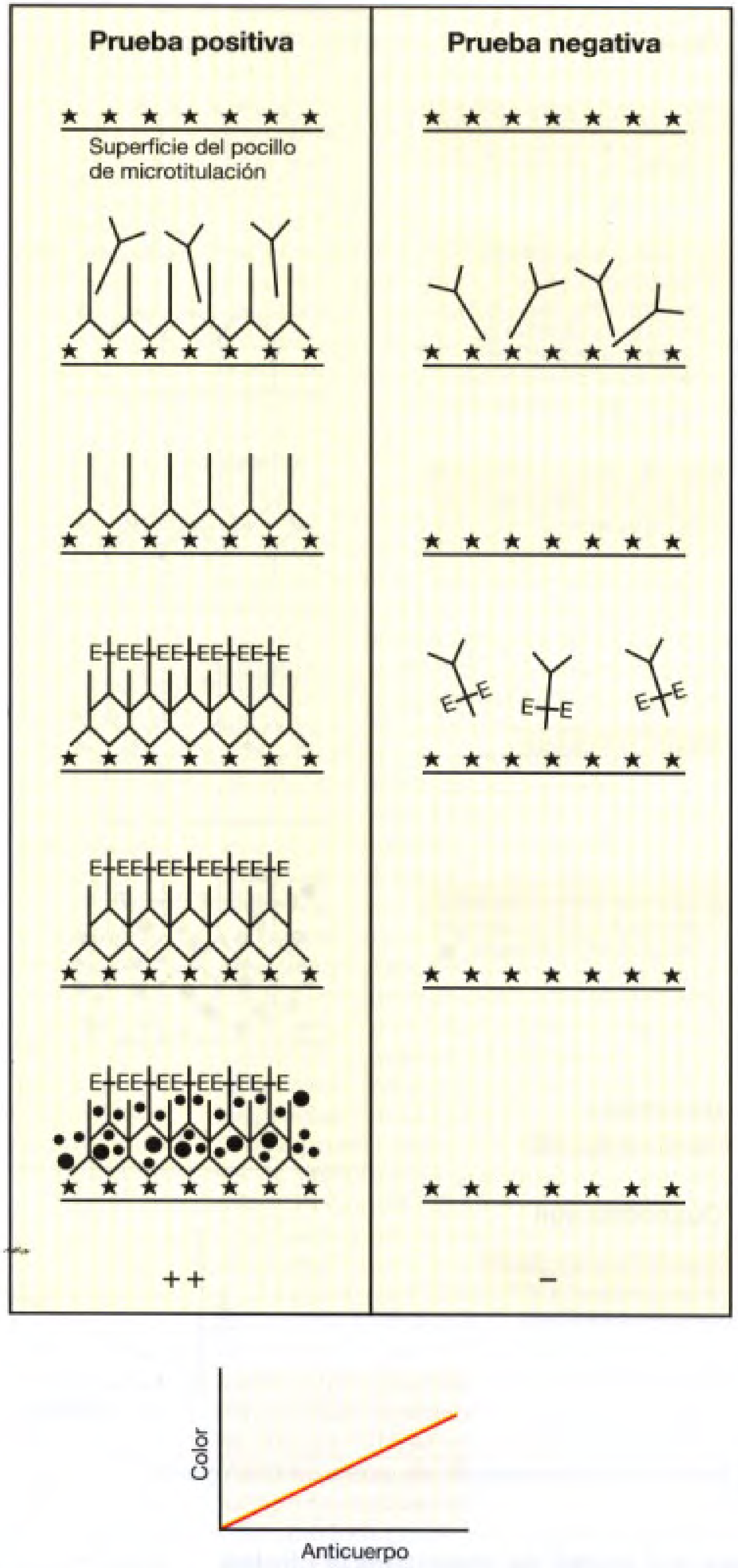

Prueba positiva
Prueba negativa
Superficie del pocillo de microtitulación
E
++
–
Color
Anticuerpo

Figura 24.23 Prueba del ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

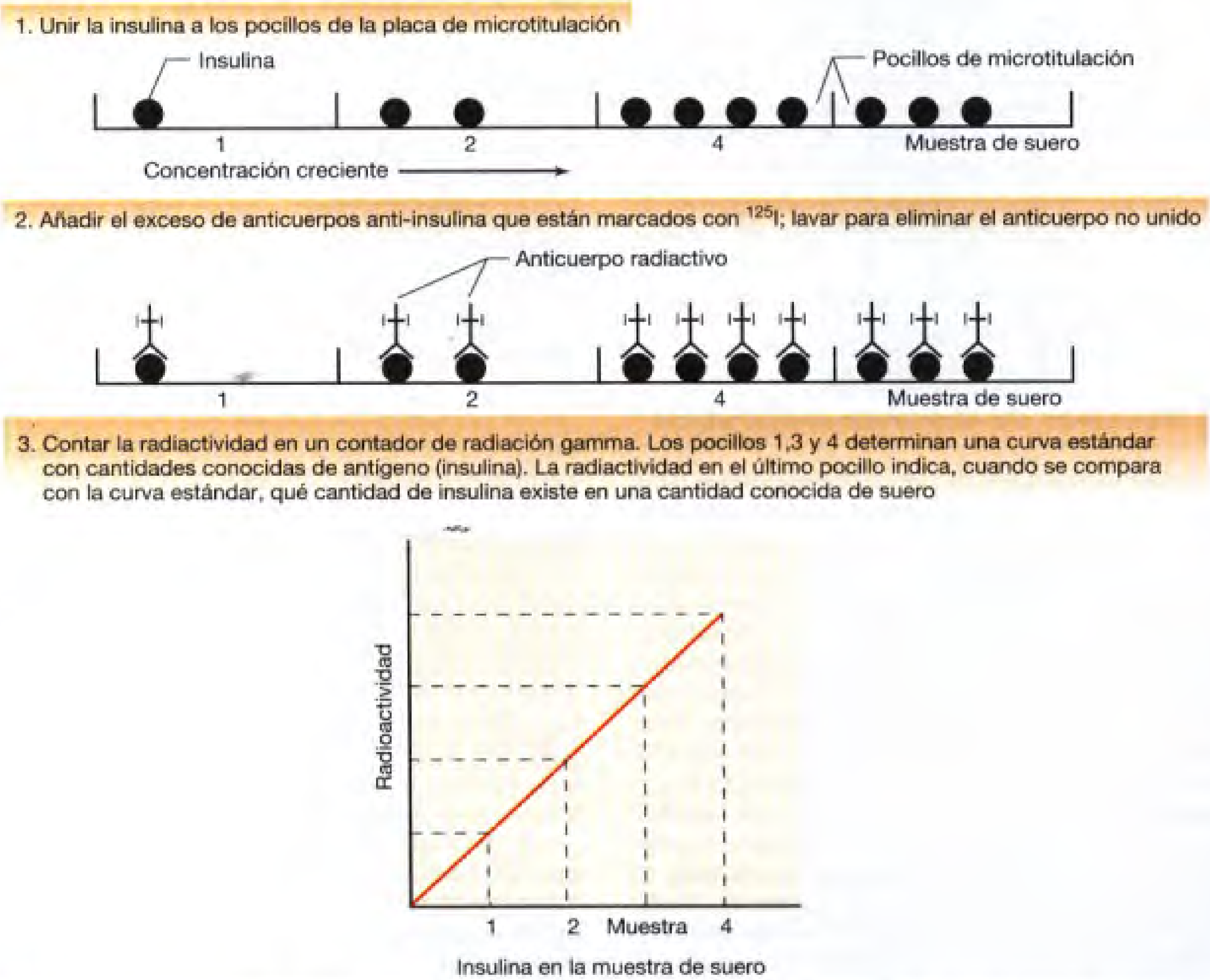
Salmonella (infección gastrointestinal), *Yersinia* (peste), *Brucella* (brucelosis), una variedad de ricketsias (fiebre de las Montañas Rocosas, tifus, fiebre Q[*]), *Vibrio cholerae* (cólera), *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculosis), *Mycobacterium leprae* (lepra), *Legionella pneumophila* (legionelosis), *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme) y *Treponema pallidum* (sífilis). Se han desarrollado también ELISAs para la detección de anticuerpos frente a *Candida* (levadura) y anticuerpos contra varios parásitos, incluyendo los que causan amebiasis, enfermedad de Chagas, esquistosomiasis, toxoplasmosis y malaria.

La velocidad, el bajo coste, la ausencia de residuos radiactivos y el largo periodo de caducidad convierten los ELISAs en unas pruebas particularmente atractivas para muchos laboratorios. Pero lo que realmente hace de los ELISAs herramientas inmunodiagnósticas importantes es su exquisita *sensibilidad*.

Radioinmunoanálisis

El *radioinmunoanálisis* (RIA) emplea isótopos radiactivos en lugar de enzimas como conjugados de anticuerpos. El isótopo iodo-125 es el más comúnmente empleado como sistema de detección, ya que las proteínas se pueden iodar con facilidad sin alterar su especificidad. El RIA se utiliza clínicamente para medir proteínas séricas como la hormona del crecimiento, glucagón, vasopresina, testosterona e insulina, presentes en el hombre en cantidades extremadamente pequeñas (Figura 24.24) y también en algunas pruebas de orina cuando se sospecha intoxicación por drogas.

En la mayor parte de los casos se utiliza un RIA *directo*. El ensayo directo es una técnica en dos pasos. En primer lugar, se añaden anticuerpos antígeno-específicos radiactivos a una serie de micropocillos de microtitulación que contienen concentraciones conocidas de antígeno puro (semejante a una hormona), que se une en primer lugar a los pocillos. Después, se mide la radiactividad en cada uno de estos pocillos estandarizados. A continuación, se deja que la muestra de antígeno de un paciente se una en otro pocillo y se añaden y se miden los anticuerpos radiactivos como antes. La cantidad de radiactividad incorporada por la


1. Unir la insulina a los pocillos de la placa de microtitulación

2. Añadir el exceso de anticuerpos anti-insulina que están marcados con ^{125}I; lavar para eliminar el anticuerpo no unido

3. Contar la radiactividad en un contador de radiación gamma. Los pocillos 1,3 y 4 determinan una curva estándar con cantidades conocidas de antígeno (insulina). La radiactividad en el último pocillo indica, cuando se compara con la curva estándar, qué cantidad de insulina existe en una cantidad conocida de suero

Figura 24.24 Radioinmunoanálisis (RIA). Utilización del RIA para detectar los niveles de insulina en el suero humano. Después de establecer una curva estándar, puede estimarse la concentración de insulina en una muestra de suero.

---

[*] *N. del T.:* el agente etiológico de la fiebre Q, previamente conocido como *Rochalimaea quintana*, familia *Ricketsiae*, ha sido recientemente reclasificado como *Bartonella quintana*, familia *Bartonellaceae*.

muestra del enfermo se compara entonces con una gráfica estándar generada a partir de los datos de unión obtenidos utilizando el antígeno puro, y la concentración del antígeno en el suero del enfermo se interpola a partir de la gráfica estándar (Figura 24.24).

El RIA presenta el mismo rango de sensibilidad que el ELISA y también puede realizarse muy rápidamente. Sin embargo, los instrumentos que se emplean para detectar la radiactividad son bastante especializados y costosos. El RIA genera una cantidad considerable de residuos radiactivos y el tiempo de desintegración radiactiva (vida media) de los isótopos radiactivos usados para la detección puede limitar la vida útil del kit de prueba. En consecuencia, el RIA se utiliza a menudo sólo cuando el ELISA no es suficientemente seguro o sensible. Por ejemplo, habitualmente el RIA es más útil que el ELISA para la detección de los niveles de proteínas del suero (como se describió con anterioridad) porque algunos componentes del suero pueden inhibir las reacciones enzima-sustrato del ELISA. De ahí que para ciertas aplicaciones cada sistema de prueba presente claras ventajas sobre el otro.

✓ 24.11 Revisión de conceptos

Los métodos ELISA y RIA son las técnicas inmunoenzimáticas más sensibles que se conocen. Ambas suponen la unión de un sistema de detección, ya sea una enzima o una molécula radiactiva, a un anticuerpo o a un antígeno, aumentando la sensibilidad. El ELISA y el RIA se emplean en labores clínicas y de investigación; estas pruebas se han diseñado para detectar el anticuerpo o el antígeno en numerosísimas aplicaciones.

- ✓ ¿Por qué las técnicas ELISA y RIA son más sensibles que los inmunoensayos estándar, tal como la precipitación y la aglutinación?
- ✓ Compare el ELISA y el RIA con respecto a su uso relativo, señalando ventajas y desventajas.

24.12 Técnicas de inmunotransferencia

Los anticuerpos se pueden utilizar en el diagnóstico clínico para identificar *proteínas* específicas individuales asociadas con patógenos específicos. El método recurre a tres técnicas expuestas previamente: (1) la separación de las proteínas en geles de poliacrilamida; (2) la transferencia (*blotting*) de proteínas desde los geles al papel de nitrocelulosa; y (3) la identificación de las proteínas por anticuerpos específicos. La transferencia de proteínas y la posterior identificación de las proteínas mediante anticuerpos específicos se denomina en ocasiones técnica de *Western blot*, para distinguirla de la técnica del *Southern blot* (DNA).

La **inmunotransferencia** es un método muy sensible para la detección de proteínas específicas en mezclas complejas. En el primer paso de una inmunotransferencia, se somete una mezcla de proteínas a electroforesis en un gel de poliacrilamida. Éste separa las proteínas en distintas bandas, cada una de las cuales representa una sola proteína de un peso molecular específico (Figura 24.25). Las proteínas se transfieren después a papel de nitrocelulosa, mediante un proceso de transferencia electroforética que fuerza a las proteínas a salir del gel y pasar al papel. En este momento, se añaden a la membrana de nitrocelulosa los anticuerpos generados contra una proteína o un grupo de proteínas del patógeno. Tras un periodo de incubación corto para que los anticuerpos se unan, se adiciona un marcador radiactivo que se une a los complejos antígeno-anticuerpo. El marcador más comúnmente utilizado es la proteína A de *Staphylococcus* iodada con iodo radiactivo, I^{125}. La proteína A posee una fuerte afinidad por los complejos antígeno-anticuerpo y se une firmemente a ellos. Una vez que el marcador radiactivo se ha unido, puede detectarse su posición vertical en la membrana exponiendo la membrana de nitrocelulosa a una película de rayos X; los rayos gamma emitidos por el I^{125} exponen la película solamente en la región donde el anticuerpo radiactivo se ha unido a los complejos antígeno-anticuerpo (Figura 24.25).

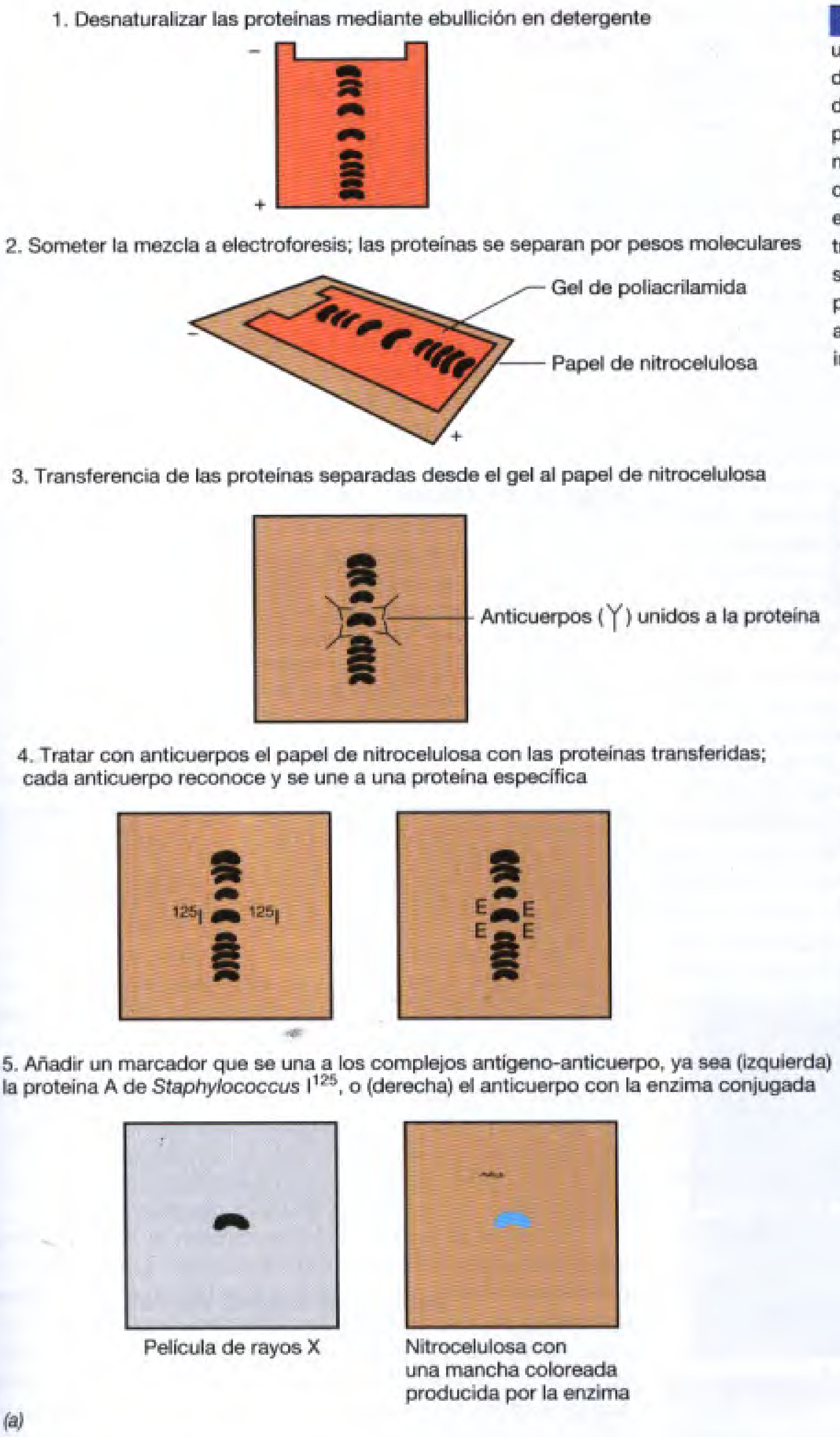
Para muchas aplicaciones clínicas, los inmunoblots emplean la tecnología del enzimoinmunoanálisis (ELISA) (*véase* Sección 24.11) para la detección de los complejos antígeno-anticuerpo unidos. Después del tratamiento de las proteínas transferidas con el anticuerpo específico, se lava el papel y después se trata con un segundo anticuerpo que se une al primero. Por ejemplo, si se utilizan anticuerpos de origen humano en el primer paso, entonces el segundo anticuerpo podría ser un anticuerpo antihumano de conejo. Una enzima se une covalentemente a este segundo anticuerpo. Los complejos originales antígeno-anticuerpo se visualizan cuando se analiza la enzima porque el producto de la reacción enzimática se colorea sobre el filtro de nitrocelulosa, en cualquier lugar en el que los anticuerpos de conejo se unan a los anticuerpos humanos. Al comparar la localización de las bandas de color sobre el papel de nitrocelulosa con la posición de las bandas coloreadas de las muestras de control, puede identificarse positivamente una proteína asociada a un determinado patógeno.

La técnica de la inmunotransferencia puede usarse para detectar el antígeno (evidencia *directa* de la presencia del patógeno) o el anticuerpo (evidencia *indirecta* de la presencia del patógeno). De ahí que este método, muy sensible y extremadamente preciso, sea análogo a las técnicas de ELISA directo e indirecto detalladas en la Sección 24.11.

El inmunoblot para VIH

Los inmunoblots han supuesto una enorme influencia clínica en el diagnóstico y confirmación de los casos de SIDA. La mayor laboriosidad, consumo de tiempo y coste del inmunoblot respecto a la prueba del ELISA, ha justificado el mayor empleo de las pruebas del ELISA-VIH para el rastreo. Sin embargo, la prueba del ELISA-VIH da lugar en ocasiones a falsos positivos. Por ello, casi siempre es necesario confirmar un resultado positivo en el ELISA mediante un inmunoblot.

Al igual que sucede con el ELISA-VIH, el inmunoblot para VIH detecta la presencia de *anticuerpos* contra VIH en una muestra de suero. Para realizar un inmunoblot, se trata una preparación purificada de VIH con el detergente dodecilsulfatosódico (SDS) que solubiliza las proteínas del VIH y también inactiva el virus. Después, las proteínas del VIH son fraccionadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Seguidamente, las proteínas del VIH son trans-


1. Desnaturalizar las proteínas mediante ebullición en detergente
–
+
2. Someter la mezcla a electroforesis; las proteínas se separan por pesos moleculares
Gel de poliacrilamida
Papel de nitrocelulosa
–
+
3. Transferencia de las proteínas separadas desde el gel al papel de nitrocelulosa
Anticuerpos (Y) unidos a la proteína
4. Tratar con anticuerpos el papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas; cada anticuerpo reconoce y se une a una proteína específica
125I
125I
E
E
E
E
5. Añadir un marcador que se una a los complejos antígeno-anticuerpo, ya sea (izquierda) la proteína A de Staphylococcus I125, o (derecha) el anticuerpo con la enzima conjugada
Película de rayos X
Nitrocelulosa con una mancha coloreada producida por la enzima
(a)

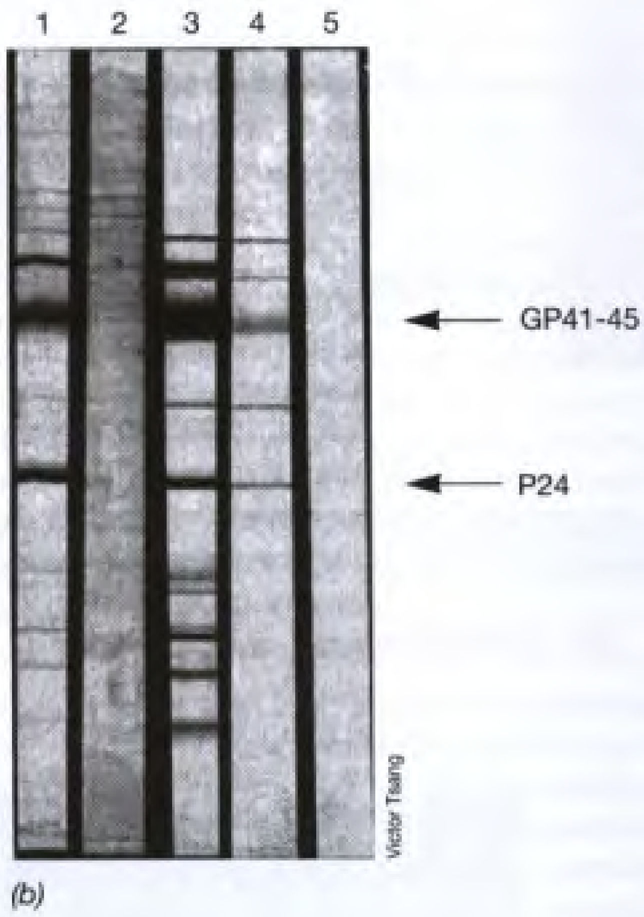

1
2
3
4
5
GP41-45
P24
Victor Tsang
(b)

Figura 24.25 El Western blot (inmunoblot) y su utilización en el diagnóstico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). (a) Protocolo de un inmunoblot. (b) Desarrollo de un inmunoblot para VIH. Las proteínas P24 y GP41-45 son proteínas de la envoltura del virus y tienen valor diagnóstico para el VIH. Carril 1, suero de control positivo (de enfermos conocidos de SIDA); carril 2, suero de control negativo (de voluntarios sanos); carril 3, fuerte positividad de la muestra de un enfermo; carril 4, débil positividad de la muestra de un enfermo; carril 5, reactivo usado como blanco para comprobar la unión inespecífica o de fondo.

feridas desde el gel a membranas de nitrocelulosa (Figura 24.25). La electroforesis resuelve al menos siete proteínas mayoritarias del VIH, y dos de ellas, designadas P24 y GP41-45, se utilizan como proteínas diagnósticas específicas en el inmunoblot del SIDA. La proteína P24 es la proteína del interior del VIH, y las proteínas GP41-45 son proteínas de la envoltura del VIH (Sección 16.16).

Después de la transferencia de las proteínas, las tiras de nitrocelulosa se incuban con una muestra de suero previamente identificado como VIH-positivo (un control positivo) mediante un ELISA-VIH. Si realmente la muestra es VIH-positiva, encontraremos anticuerpos contra las proteínas VIH que se unirán a las proteínas del VIH separadas en el papel de nitrocelulosa (Figura 24.25). Para detectar si los anticuerpos de una muestra de suero se han unido a los antígenos del VIH, se añade a las tiras un *anticuerpo detector* que es un anticuerpo anti-IgG humano conjugado a peroxidasa. Si se une el anticuerpo detector, la actividad de la enzima conjugada formará una banda marrón sobre la tira en el lugar de la unión del anticuerpo tras la adición del sustrato. Se analiza el suero de un enfermo con un resultado positivo en ELISA-VIH en paralelo con un suero de control positivo; si la posición de las bandas en el enfermo y en los sueros de control positivos son idénticas, puede confirmarse que el enfermo es VIH-positivo; también se analizan en paralelo los sueros de control negativos, demostrándose la ausencia de bandas (Figura 24.25).

Aunque la intensidad de las bandas obtenidas en el inmunoblot para VIH varía en cierta medida de una muestra a otra (Figura 24.25*b*), generalmente la interpretación de un inmunoblot es inequívoca, y de ahí que sea una prueba valiosa para confirmar los ELISA-VIH positivos y desechar los ELISA-VIH falsos positivos. Para hacer clínicamente accesible el inmunblot para VIH, se dispone de tiras comerciales de nitrocelulosa conteniendo los antígenos del VIH inactivados (previamente se han separado mediante electroforesis). Las tiras separadas pueden incubarse directamente con las muestras de suero del enfermo y del control, y después tratarlas con el anticuerpo detector.

Esta técnica se emplea también para confirmar la especificidad de las pruebas de rastreo de anticuerpos en la enfermedad de Lyme (*véase* Tabla 24.5). Sin embargo, el coste económico, los requerimientos técnicos y el tiempo que implican, hace que las pruebas de inmunotransferencia no lleguen probablemente a sustituir los métodos de ELISA, más rápidos y de bajo coste para el rastreo general.

✓ 24.12 Revisión de conceptos

Las técnicas de inmunotransferencia pueden utilizarse para detectar anticuerpos frente a antígenos específicos o para detectar la presencia de los propios antígenos. Los antígenos se someten a electroforesis, se transfieren a un filtro y se exponen a un anticuerpo. Los complejos inmunes se visualizan con el uso de anticuerpos marcados con enzimas o isótopos radiactivos. Los inmunoblots son muy sensibles y precisos, aunque tienen el inconveniente de ser complejos y laboriosos.

- ✓ ¿Qué ventajas presenta el inmunoblot sobre inmunoensayos como el ELISA o el RIA?
- ✓ ¿Por qué métodos de detección por inmunotransferencia no se utilizan para el escrutinio general del VIH?

III MÉTODOS MOLECULARES Y VISUALES EN EL DIAGNÓSTICO

Métodos extremadamente sensitivos basados en principios de biología molecular o en microscopía electrónica son adecuados para detección de patógenos y genomas. Estos métodos no dependen del aislamiento del patógeno y de su crecimiento, ni de la detección de respuesta inmune frente al patógeno. Mientras que los virus son identificados en el cultivo de células, métodos independientes del crecimiento basados en métodos físicos y moleculares son ampliamente utilizados.

24.13 Sondas de ácidos nucleicos

La emergencia de la biología molecular ha dado lugar a nuevas herramientas moleculares que se han adaptado rápidamente al campo del diagnóstico microbiológico. Este nuevo enfoque utiliza factores *genotípicos* más que *fenotípicos* para identificar patógenos específicos. El poder del diagnóstico basado en el DNA se debe a varios hechos: (1) los ácidos nucleicos pueden medirse de los tejidos infectados; (2) los ácidos nucleicos pueden medirse y visualizarse; (3) la secuencia de nucleótidos en una determinada molécula de DNA es tan específica que pueden usarse los análisis de hibridación para diagnósticos clínicos fiables; (4) las secuencias pueden amplificarse para incrementar la cantidad necesaria para el análisis.

Sondas de ácidos nucleicos

Una de las herramientas analíticas más potentes de las que disponen los microbiólogos clínicos es la *hibridación de ácidos nucleicos*. Esta técnica no detecta un organismo entero o sus productos (por ejemplo, antígenos), sino que detecta la presencia o ausencia de *secuencias de DNA específicas* que se asocian con un organismo específico. Para identificar un microorganismo a través del análisis del DNA, el microbiólogo clínico debe disponer de una *sonda de ácidos nucleicos* para ese microorganismo, una *sola hebra* de DNA que contenga secuencias características del organismo. La **sonda** puede tener una longitud de hasta varias kilobases, si bien son muy específicos los oligonucleótidos sintéticos de unas 20 bases o menos. Cuando un microorganismo, en una muestra clínica, contiene secuencias de DNA complementarias a las de la sonda, pueden hibridarse las dos secuencias (siguiendo una preparación adecuada de la muestra para dar lugar a un DNA monocatenario del microorganismo), formándose una molécula de *dos cadenas* (Figura 24.26). Para detectar que ha ocurrido una reacción, se marca la sonda con una *molécula indicadora (reporter)*, un isótopo radiactivo, una enzima o un compuesto fluorescente, que pueden medirse en cantidades pequeñas tras la hibridación. Según el indicador utilizado (los isótopos radiactivos son los más sensibles), se pueden detectar cantidades tan pequeñas como 0,25 μg de DNA por muestra.

Las sondas de ácidos nucleicos ofrecen muchas ventajas sobre las pruebas inmunológicas clínicas. Los ácidos nucleicos son mucho más estables que las proteínas a altas temperaturas, con pH alto, los solventes orgánicos y otros compuestos químicos. Esto significa que una muestra clínica puede tratarse previamente para eliminar el material que más interfiera y dejar libre el ácido nucleico. Dada la relativa estabilidad de los ácidos nucleicos, las sondas de ácidos nucleicos pueden detectar un organismo que ya no esté vivo. Además, las sondas de ácidos nucleicos son entidades más definidas que los anticuerpos; la composición de una sonda se puede comprobar con precisión mediante el desemparejamiento de una sola base. Siempre que sea necesario, pueden generarse nuevas moléculas de sondas cortas en sintetizadores de DNA, eliminando el complejo mecanismo de producción de anticuerpos.

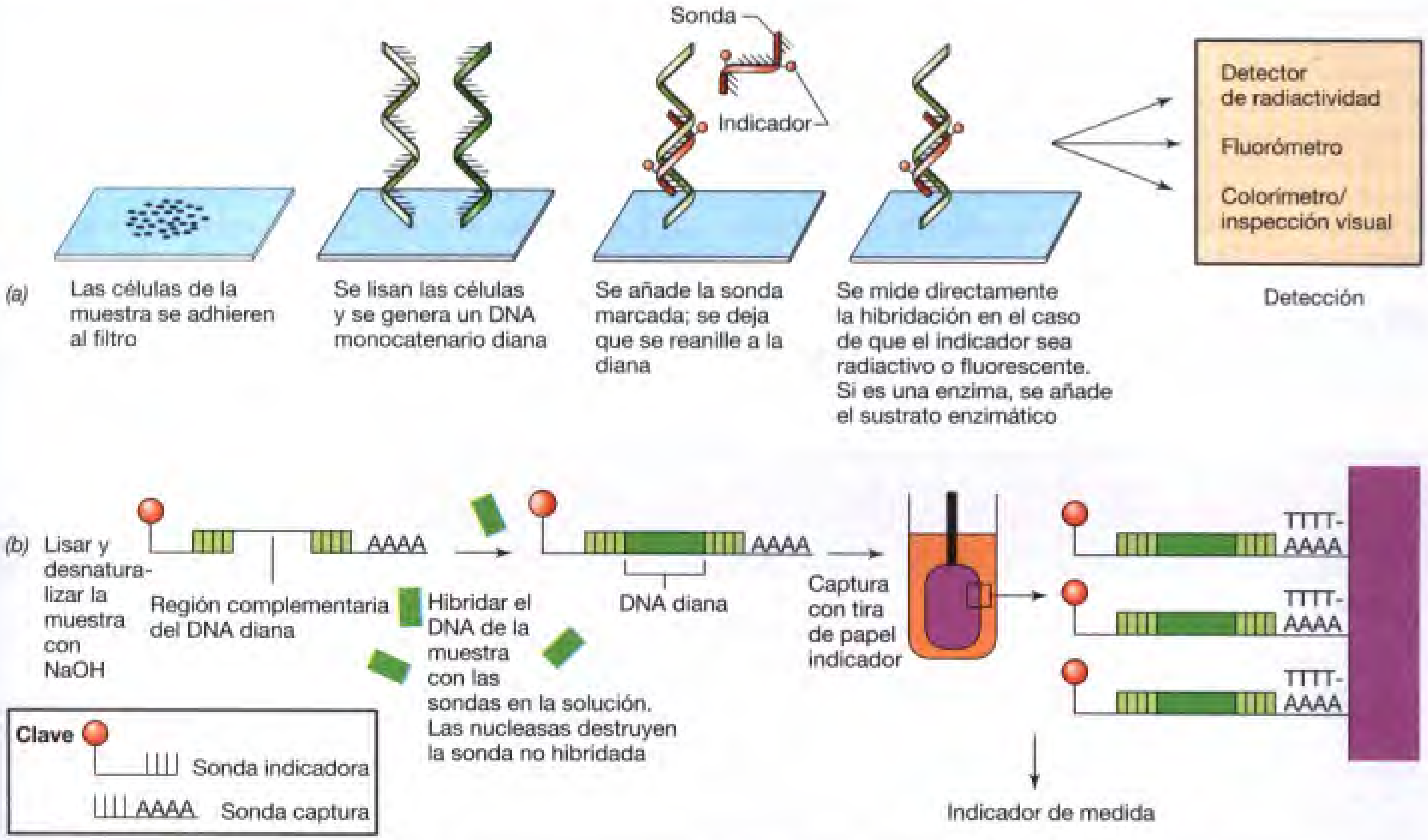

Sonda
Indicador
Detector de radiactividad
Fluorómetro
Colorímetro/ inspección visual
(a)
Las células de la muestra se adhieren al filtro
Se lisan las células y se genera un DNA monocatenario diana
Se añade la sonda marcada; se deja que se reanille a la diana
Se mide directamente la hibridación en el caso de que el indicador sea radiactivo o fluorescente. Si es una enzima, se añade el sustrato enzimático
Detección
(b) Lisar y desnaturalizar la muestra con NaOH
AAAA
Región complementaria del DNA diana
Hibridar el DNA de la muestra con las sondas en la solución. Las nucleasas destruyen la sonda no hibridada
DNA diana
Captura con tira de papel indicador
TTTT-
AAAA
Indicador de medida
Clave
Sonda indicadora
AAAA Sonda captura

Figura 24.26 Metodología de la utilización de una sonda de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico. (a) Prueba del filtro de membrana. El sistema de detección (indicador) puede ser un radioisótopo, un colorante fluorescente o una enzima. (b) Prueba de la tira de papel indicador. En esta prueba se utiliza un indicador dual o una sonda de captura. La sonda de captura contiene poli-dA que hibrida con un oligonucleótido poli-dT unido a la tira de papel indicador, enlace del complejo oligonucleótido-blanco indicador. El complejo puede detectarse como en (a).

Las sondas de ácidos nucleicos son también muy sensibles. Con la tecnología actual es posible detectar menos de $1\ \mu g$ de ácido nucleico por muestra, lo que equivale aproximadamente a 10^6 células bacterianas o partículas de virus. Aunque las sondas utilizadas de esta manera no son tan sensibles como el cultivo directo (donde pueden detectarse de 1 a 10 células por muestra), la metodología de las sondas puede resultar útil en aquellas situaciones en las que el cultivo del organismo sea difícil o prácticamente imposible.

PCR y sondas de ácidos nucleicos

Uno de los métodos más prometedores en el diagnóstico clínico quizá sea el empleo de sondas de secuencia específica para amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del DNA o el RNA procedentes de patógenos específicos. Como se expuso en la Sección 10.17, la PCR utiliza dos oligonucleótidos de secuencia específica para amplificar el DNA de interés. Una amplificación de DNA de millones de veces o más, aumenta la sensibilidad de la sonda y, en teoría, permite que este método detecte DNA a partir de una sola célula bacteriana. Por ejemplo, puede usarse sondas de un patógeno para examinar el DNA procedente del tejido que se sospecha infectado, incluso en ausencia de patógeno observable en el cultivo.

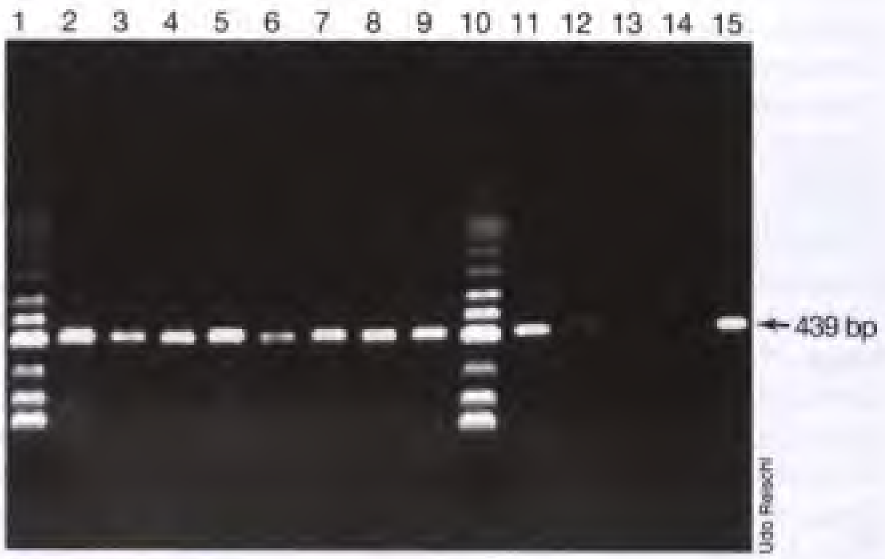

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
439 bp
Udo Reischl

Figura 24.27 Análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de *Mycobacterium tuberculosis* en el esputo de un enfermo, para el diagnóstico de tuberculosis. Como fuente de DNA se emplearon muestras de esputo de los enfermos. Se inició la amplificación con un par cebador que dió el producto de 439 bases de pares esperado, cuando se usó un cultivo puro de *M. tuberculosis* como fuente de DNA (carril 15). Los carriles 2 a 9, 11 y 12 proceden de esputos positivos para *M. tuberculosis* (solamente el carril 12 da una débil positividad). Los carriles 13 y 14 proceden de muestras de esputo negativas para *M. tuberculosis*. Los carriles 1 y 10 son marcadores de referencia de peso molecular. Para una descripción de la PCR, véase la Sección 10.17.

UNIVERSIDAD DE TALCA
BIBLIOTECA CENTRAL

Estos métodos son especialmente útiles en la identificación de infecciones víricas e intracelulares. La presencia de un segmento de gen adecuadamente amplificado (Figura 24.27) confirma la presencia del patógeno. En la Tabla 24.9 se enumeran distintos organismos específicos para los que se utilizan métodos de hibridación o de PCR. A continuación, consideraremos varios ejemplos específicos de sondas de ácidos nucleicos y expondremos algunas aplicaciones con mayor detalle.

VIH y carga vírica

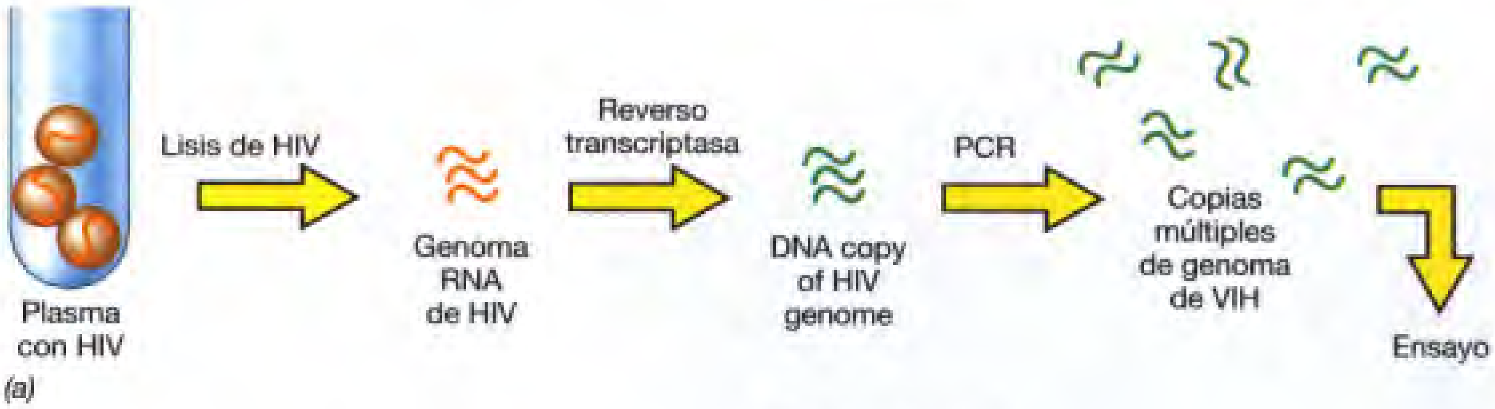
Otro de los usos de la PCR es el test de **carga vírica** en individuos infectados por el VIH. La carga vírica es el número de copias de RNA en el suero de una persona infectada por VIH. Como discutiremos en la Sección 26.14, el VIH es encontrado después de la infección en el suero de los individuos infectados. La cantidad de VIH, o la carga vírica, es un indicador de la progresión de la enferemedad; cuando la carga vírica sea alta indica mal pronóstico y cuando sea baja, buen pronóstico (Figura 24.28). La carga vírica es una excelente confirmación de lo buena que es la terapia anti VIH (Figura 24.28, y Secciones 26.14 y 20.10).

La cuantificación de carga vírica se hace posible por PCR cuantitativa (por ejemplo, el ampliamente usado Amplicor VIH-1 prueba de monitor, manufacturado por Roche Sis-

TABLA 24.9 Patógenos que pueden identificarse con sondas de ácidos nucleicos, incluida la PCR

Patógeno	Enfermedad
Bacteria	
Campylobacter spp.	Toxiinfección alimentaria
Chlamydia trachomatis	Síndromes venéreos; tracoma
Enterococcus spp.	Enfermedad nosocomial
Escherichia coli (cepas enteropatógenas)	Enfermedad gastrointestinal
Haemophilus influenzae	Meningitis infecciosa
Legionella pneumophila	Neumonía
Listeria monocytogenes	Listeriosis
Mycobacterium avium	Tuberculosis
Mycobacterium tuberculosis	Tuberculosis
Mycoplasma hominis	Infección del tracto urinario; enfermedad inflamatoria pélvica
Mycoplasma pneumoniae	Neumonía
Neisseria gonorrhoeae	Gonorrea
Neisseria meningitidis	Meningitis
Rickettsia spp.	Tifus, fiebres hemorrágicas
Salmonella spp.	Enfermedad gastrointestinal
Shigella spp.	Enfermedad gastrointestinal
Staphylococcus aureus	Secreciones purulentas (forúnculos, vesículas, infecciones cutáneas piógenas)
Streptococcus pyogenes	Escarlatina, fiebre reumática; «faringitis estreptocócica»
Streptococcus pneumoniae	Neumonía
Treponema pallidum	Sífilis
Hongos	
Blastomyces dermatitidis	Blastomicosis
Candida spp.	Candidiasis, afta
Coccidioides immitis	Coccidioidomicosis
Histoplasma capsulatum	Histoplasmosis
Virus	
Citomegalovirus	Infecciones virales congénitas
Virus Epstein-Barr	Linfoma de Burkit; mononucleosis
Virus de la hepatitis A, B, C, D y E	Hepatitis
Virus del herpes (tipos I y II)	Úlceras por frío; herpes genital
Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)
Virus del papiloma humano	Verrugas genitales; cáncer cervical
Gripe	Enfermedad respiratoria
Virus del polioma	Enfermedad neurológica
Rotavirus	Enfermedad gastrointestinal
Protozoos	
Leishmania donovani	Leismaniasis
Plasmodium spp.	Malaria
*Pneumocystis carinii**	Neumonía
Trichomonas vaginalis	Tricomoniasis
Trypanosoma spp.	Tripanosomiasis

* Actualmente se clasifica *Pneumocystis carinii* como un hongo patógeno.



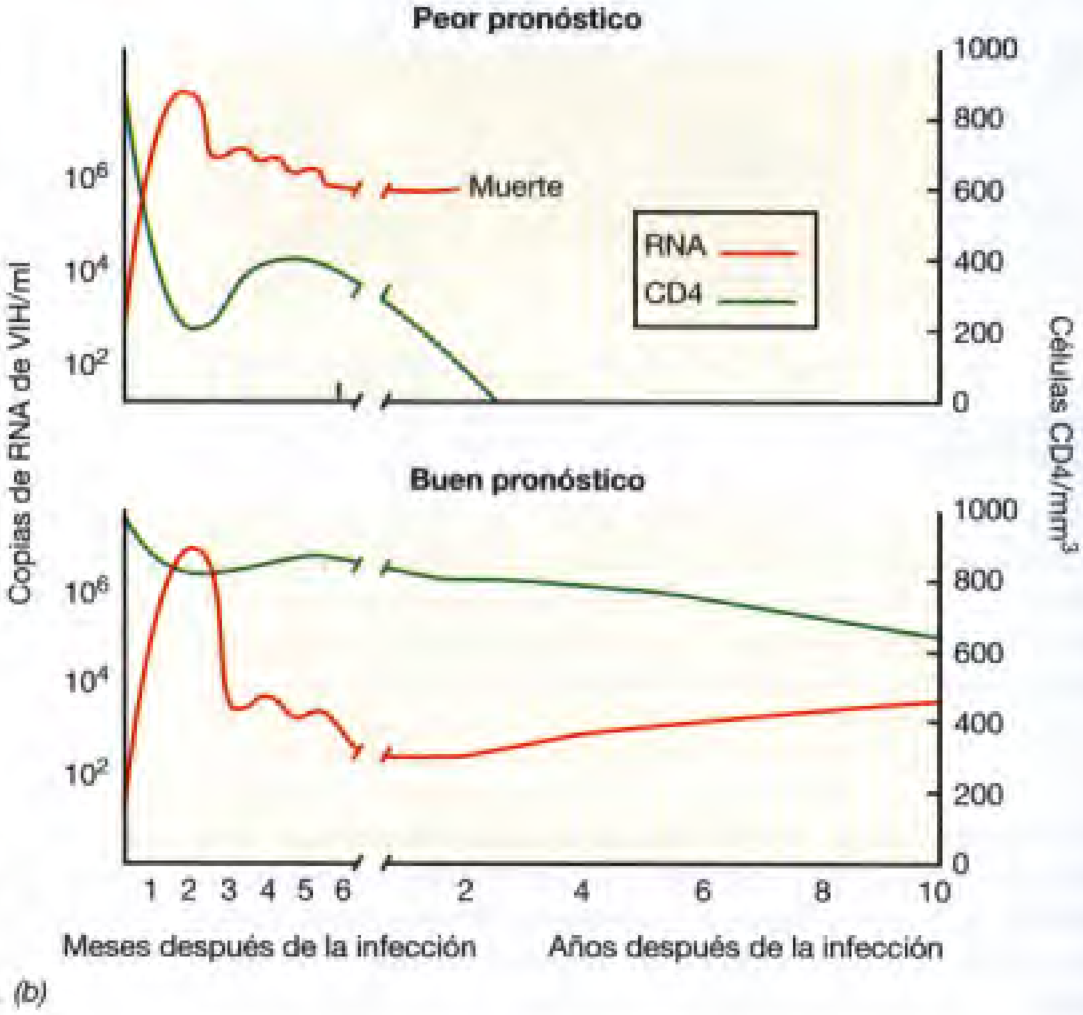


Figure 24.28 Carga vírica de VIH. (a) Detección de VIH con RT-PCR (reversotranscriptasa unida a la reacción en cadena de la polimerasa). Las copias de VIH son comparadas cuantitativamente con las copias de DNA de un control que es amplificado en la misma PCR. La carga vírica de VIH es el número de copias por mililitro de plasma del paciente. Para una discusión sobre la reverso transcriptasa y la técnica de PCR, *véase* Secciones 10.17 y 16.14, respectivamente. El tiempo transcurrido para la infección de VIH se determina por la RT-PCR. La carga vírica determina el progreso de la infección, a tiempos sucesivos después de la misma. Los células T CD4 son contadas por milímetro cúbico (*véase* Figura 24.21). En el panel superior, una carga vírica de 10^4 corresponde a una carga vírica por debajo de lo normal (la carga vírica normal = 600-1500/ mm³), indicando peor pronóstico y una muerte prematura del paciente. En el panel inferior, una carga vírica de menos de 10^4 por mililitro corresponde a un número normal de CD4, indicando un buen pronóstico y una supervivencia larga del paciente. Esta técnica se usa para monitorizar el curso de la infección y es particularmente útil para determinar la terapia antivírica. Los datos están adaptados del Centro de Prevención de Enfermedades Infecciosas, Atlanta, GA, Estados Unidos (EE.UU).

temas Moleculares, Inc.). El método empleado se conoce como RT-PCR (reverso transcriptasa PCR) y se utiliza para amplificar DNA de los RNA víricos (Sección 10.17). En primer lugar se lisan los VIH del plasma y se libera el genoma vírico. El RNA después de la precipitación con isopropanol, hace la copia de DNA con la reverso transcriptasa. La copia de DNA se utiliza para la amplificación del DNA, la del *gag* (Sección 16.14), rindiendo una *amplificación* (virus amplificado) de 155 bp en las muestras VIH positivas. Usando un templete de cantidad conocida se puede comparar con un DNA estandar y la cantidad de VIH puede ser determinada. Comparando la carga vírica a lo largo del tiempo, se puede hacer un pronóstico relativo a cada enfermo (Figura 24.28).

El uso más importante de esta técnica consiste en controlar la quimioterapia. Después de un tratamiento, la carga vírica puede ser limitada (menos de 500 copias del VIH por mililitro de sangre), como se indica en la Figura 24.29. De todos modos un número pequeño de partículas víricas puede sufrir mutación, lo que redunda en resistencia al tratamiento y resurgimiento de la infección, derivando en una alta carga vírica. La monitorización del VIH se utiliza para detectar los mutantes resistentes al tratamiento, necesitándose cambios en el tratamiento. Varios otros tratamientos basados en la amplificación se utilizan para monitorizar la detección de VIH, en el rango de 0 a 500 copias del virus por mililitro de sangre, un nivel necesario para justificar cualquier propuesta de que es posible curar el HIV usando drogas.

Sondas en el laboratorio clínico

En la mayoría de las pruebas clínicas, se tratan colonias procedentes de placas o de piezas del tejido infectado con álcali fuerte, generalmente NaOH, con el fin de lisar las células y desnaturalizar parcialmente el DNA, con lo que se forman moléculas monocatenarias (Figura 24.26). Después, esta mezcla se adhiere a un filtro o se deja en solución (en las pruebas que utilizan tiras de papel indicador, *véase* más adelante), y se añade la sonda marcada. Se deja que la hibridación tenga lugar a una temperatura adecuada para la formación de un dúplex estable, para lo que es necesaria una considerable homología de secuencia entre el DNA diana y el DNA sonda (la temperatura que realmente se usa en una determinada prueba depende de la longitud y la com-

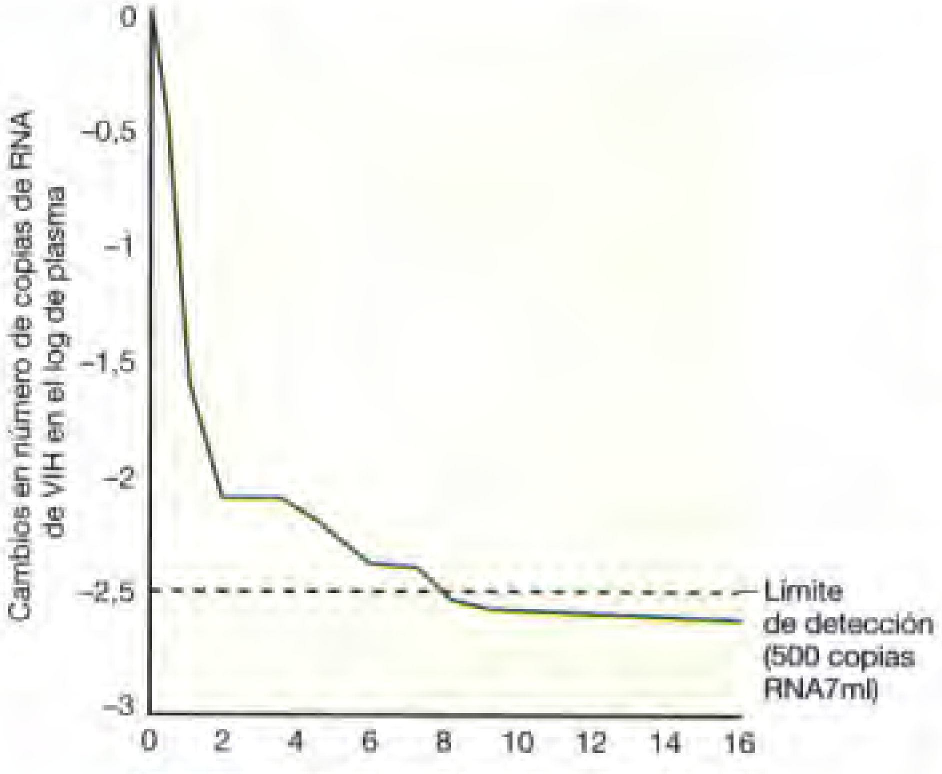


Figura 24.29 Número de copias de VIH en plasma después del inicio con anti-retrovirales. La RT-PCR se usa para detectar la carga vírica despúes de un periodo de16 semanas. Los datos que se muestran corresponden al $\log_{10}$ número de copias de RNA de VIH indica estabilidad, un rápido descenso por debajo de los límites de detección (500 copias/mililitro de sangre). Los datos están adaptados del Centro de Prevención de Enfermedades Infecciosas, Atlanta, GA, EE.UU.

posición nucleotídica de la sonda y del DNA diana). Tras un lavado para eliminar cualquier DNA sonda que no haya hibridado, la intensidad de la hibridación se mide utilizando una molécula indicadora unida a la sonda. Dependiendo del tipo de marcaje de la sonda, se medirá la radiactividad, la actividad enzimática o la fluorescencia de un colorante unido.

Se han comercializado sondas de ácidos nucleicos para identificar varios de los principales patógenos microbianos, que se usan habitualmente para la detección de *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* (*véase* Tabla 24.9, y Secciones 26.12 y 26.13). Sin embargo, además de su utilidad clínica, las sondas han encontrado una enorme aplicación en la industria de la alimentación y en los organismos sanitarios oficiales que controlan los alimentos. Los sistemas de detección por sonda pueden utilizarse para la monitorización rutinaria en los alimentos del contenido de importantes patógenos como *Salmonella* y *Staphylococcus*. En las pruebas de alimentos que utilizan sondas, habitualmente se utiliza un periodo de enriquecimiento para favorecer la multiplicación de un pequeño número de células en los alimentos, hasta alcanzar un número detectable por la sonda; sin embargo, el uso de las técnicas de amplificación génica mediante PCR hace innecesario el periodo de enriquecimiento.

El diseño de sondas que van a ser utilizadas en la industria de la alimentación supone el empleo de dispositivos especiales como sondas para eliminar el DNA hibridado de la solución. Aquí se utilizan dos componentes de las sondas, uno que sirve como *sonda indicadora* y el otro como *sonda de captura* (Figura 24.26). Tras la hibridación de la sonda indicadora o de la sonda de captura con el DNA diana, el dispositivo especial que contiene la secuencia complementaria de la sonda de captura (generalmente poli dT para la captura de poli dA en la sonda) (*véase* Figura 24.26*b*) se inserta en la solución de hibridación, y atrapa el DNA hibridado para su eliminación y cuantificación.

Así mismo, se están desarrollando sondas para la detección de ciertos virus oncogénicos. Por ejemplo, se dispone en la actualidad de una sonda para detectar secuencias de DNA características de los virus del papiloma humano. Estos virus pueden causar cáncer de piel y de cérvix en humanos (Sección 9.11), y un grupo específico de virus del papiloma produce verrugas genitales. En mujeres, se ha asociado una mayor incidencia de infección genital por el virus del papiloma con un aumento del riesgo de cáncer cervical. La sonda de DNA desarrollada para los virus del papiloma puede utilizarse para la búsqueda, por hibridación, de secuencias de los virus del papiloma en los tejidos que se han resecado durante un examen cervical. La detección y el tratamiento precoces de las infecciones por los virus del papiloma disminuye el riesgo de cáncer cervical.

A pesar de ello, los avances recientes en el conocimiento de la filogenia bacteriana, basada en la secuenciación del RNA ribosómico (rRNA) 16S (Sección 11.5), nos permite ahora construir nuevas sondas de ácidos nucleicos más específicas. Por ejemplo, el *ribotipaje* supone un nuevo método basado en sondas de DNA que reconocen genes conservados de RNA. El ribotipado pone de manifiesto los modelos de restricción del DNA exclusivos que tienen los genes de rRNA cuando el DNA de un organismo determinado es digerido con endonucleasas de restricción (Sección 10.12). El DNA digerido es separado en geles de agarosa y una sonda de rRNA es usada para detectar los patrones únicos de restricción de rRNA (Sección 11.10 y Figura 11.20). Dentro de una *especie*, y especialmente dentro de una *cepa*, las secuencias de DNA y los patrones de restricción de los genes que codifican están muy conservados y sirven como impresión digital molecular para ese organismo. Puesto que todos los organismos poseen genes ribosómicos, esta técnica se aplica universalmente y va ganando cada vez más aceptación como herramienta clínica y filogenética.

✓ 24.13 Revisión de conceptos

La hibridación representa una poderosa herramienta para el diagnóstico de los microorganismos que causan las enfermedades. Para diseñar una sonda debe disponerse de una secuencia de ácido nucleico específica del virus o del patógeno microbiano de interés. Quizás el uso más generalizado se usa amplificando el gen (PCR). Además de su utilización en el diagnóstico clínico, las sondas se aplican también en la monitorización de alimentos y del medio ambiente.

- ✓ ¿Qué ventajas y desventajas presenta la hibridación de ácidos nucleicos sobre los métodos de cultivo estándar para la identificación de microorganismos?

✓ Cite un ejemplo en el que la identificación de un patógeno pueda hacerse con una sonda de ácidos nucleicos y no recurriendo a técnicas de cultivo estándar.

24.14 Virología diagnóstica

Los virus patógenos se comportan como parásitos de animales y suponen un problema diferente al de las bacterias. Por ejemplo, los virus no pueden cultivarse directamente en medios artificiales sino que crecen en las células del hospedador (Capítulo 8). Los virus no crecen fuera de la célula, no pueden ser cultivados en medio artificial, tienen que crecer dentro de las células del mamífero. Sin embargo los virus pueden ser detectados o sus efectos citopáticos pueden observarse directamente, además de que se dispone de diversos tests in vitro para identificar los patógenos víricos por medios directos o indirectos.

Crecimiento de virus *in vitro*

En primer lugar, el cultivo de virus en el laboratorio a partir de materiales clínicos es más difícil, laborioso y especializado que el de la mayoría de los patógenos bacterianos, debido a que los virus crecen únicamente en células vivas. En la Sección 9.3 expusimos la utilización de los cultivos celulares para el crecimiento de los virus. Estos cultivos se emplean comúnmente en virología diagnóstica. Varias líneas celulares humanas se utilizan para la propagación de los virus. Estas líneas celulares crecen rápidamente y de forma infinita y son ifectadas por los virus de mamíferos.

Además de estas dos líneas celulares, que pueden ser mantenidas en el laboratorio indefinidamente, también pueden lograrse cultivos a partir de riñones de mono Rhesus. Las líneas celulares de riñón de mono se denominan *primarias* porque no se han mantenido por pases sucesivos en el laboratorio. Las células de riñón de mono primarias permiten el crecimiento de numerosos virus patógenos y por ello son valiosas en el aislamiento inicial de virus desconocidos.

Microscopía electrónica

Además de las herramientas descritas con anterioridad, la virología diagnóstica puede recurrir a la microscopía electrónica. La distinta morfología de muchos virus (Capítulo 9) explica que pueda detectarse con frecuencia su presencia en muestras clínicas, mediante la observación de la muestra en microscopía electrónica (Figura 24.30). En la mayoría de las muestras, en primer lugar, las partículas víricas deben concentrarse y separarse de los tejidos, utilizándose diversas técnicas, generalmente centrifugación y filtración, para conseguir una muestra enriquecida en partículas víricas. Aunque no es tan fiable como los métodos inmunológicos o los que usan sondas de ácidos nucleicos, la observación de las partículas víricas de una morfología específica, en un tipo particular de tejido en el hombre, sirve frecuentemente como indicación presuntiva de enfermedad. Para aumentar la sensibilidad y especificidad de este método puede utilizarse el tratamiento de la muestra con anticuerpos preparados contra determinados virus; dichos anticuerpos son capaces de producir la aglutinación de las partículas virales, permitiendo su distinción entre los restos celulares en el microscopio electrónico. También pueden visualizarse los virus después del tratamiento de las muestras con anticuerpos antivirales conjugados con metales pesados (*véase* Sección 24.9). La utilización de las técnicas de tinción negativa (Figura 24.30) con el microscopio electrónico permite el análisis en unos 20 minutos tras la recogida de la muestra.

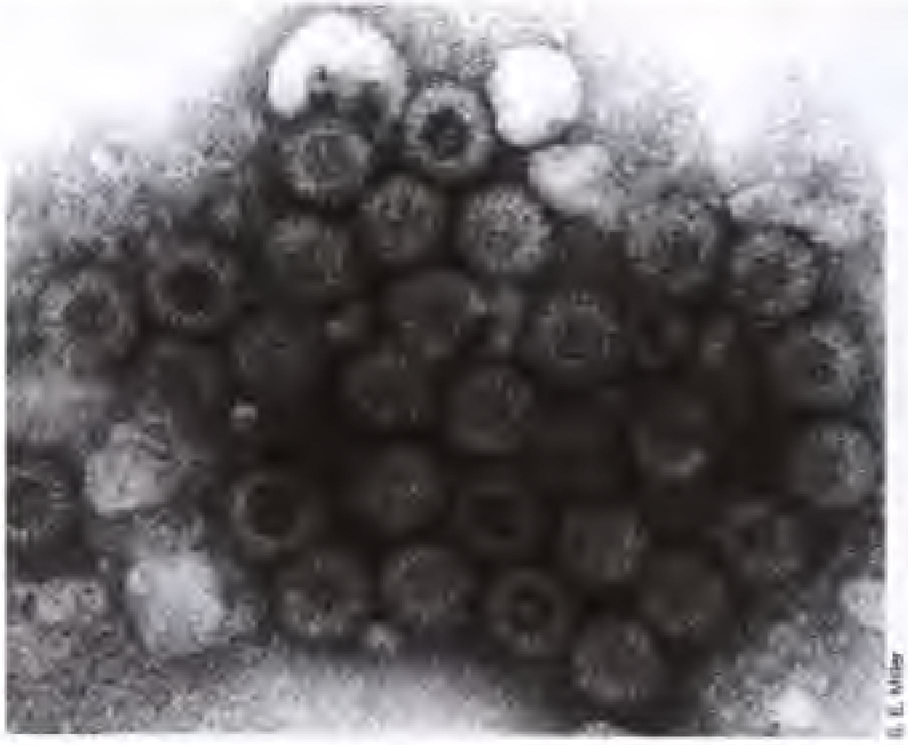

G. E. Miller

Figura 24.30 Observación mediante microscopía electrónica de muestras clínicas para detección de virus. Rotavirus humano obtenido de una muestra fecal. La diferente naturaleza esférica de los virus junto a su reservorio, constituye un criterio de diagnóstico importante. Cada partícula del rotavirus tiene un diámetro aproximado de 75 nm.

Pruebas para otros virus

En la Tabla 24.10 se resumen algunas técnicas de laboratorio que se utilizan en virología diagnóstica. En muchos casos el inmnunodiagnóstico es la técnica elegida (*véanse* Secciones 24.5-24.12) y las sondas de ácidos nucleicos (*véase* Sección 24.13) son usadas para indentificaciones víricas.

Muchas pruebas inmnunológicas se hacen por ELISA, que detecta las partículas víricas (*véase* Sección 24.11 y Figura 24.22), o por métodos de anticuerpos fluorescentes que son usados para localizar las células que contienen virus (*véase* Sección 24.10 y Figura 24.18*b*). En la prueba indirecta, los virus no son detectados por sí mismos, pero los anticuerpos que se unen a los virus son considerados como prueba de la infección. Por ejemplo, los tests rutinarios del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) comprenden el test ELISA y el test inmnunotransferencia (*véase* Secciones 24.11 y 24.12). Los dos detectan *anticuerpos* frente al virus, no el HIV mismo. Sin embargo la *carga vírica* es un método que se utiliza rutinariamente para detectar la presencia directa del VIH, como se vio en la Sección 24.13. La aglutinación es otro método de detectar directamente el virus. Anticuerpos conjugados con bolitas de látex pueden ser utilizados para detectar la presencia de muestras en lisado de tejidos (*véase* Sección 24.8).

TABLA 24.10 Algunas técnicas de laboratorio que se usan en virología diagnóstica[a]

Enfermedad	Posible causa viral	Fuente de la muestra	Técnica de inoculación
Infección del tracto respiratorio superior	Rinovirus Coronavirus Adenovirus	Fluido de la nasofaringe o tráquea (aspirado)	Cultivo de fibroblastos humanos
Neumonía	Gripe	Fluido o torunda nasofaríngeos	Cultivos de fibroblastos humanos o huevos de embrión
Sarampión	Virus del sarampión	Fluido o torunda nasofaríngeos	Células de riñón de mono
Exantema vesicular	Herpes simple	Fluido vesicular por aspiración	Cultivo de fibroblastos humanos y células de riñón de mono
Diarrea	Rotavirus (lactantes) Agente Norwalk (adultos)	Heces o torunda rectal	Buscar las partículas víricas características con el microscopio electrónico (Figura 24.30)
Meningitis no bacteriana	Enterovirus Parotiditis Herpes simple	Líquido raquídeo	Cultivo de fibroblastos humanos o de riñón de mono

[a] En el diagnóstico de infecciones víricas también se utilizan mucho los métodos inmunológicos y los métodos con sondas de ácidos nucleicos (*véase* Secciones 24.5-24.13).

Sondas de ácidos nucleicos y PCR son otros métodos empleados en la virología clínica (*véase* Sección 24.13 y Tabla 24.9).

Muchas pruebas diagnósticas de la presencia de virus se utilizan bajo especiales circunstancias. Las infecciones víricas rutinarias se basan en la sintomatología clínica. Dado el coste y la experiencia técnica necesaria para los procedimientos de detección de virus (por ejemplo los laboratorios que deban cultivar y crecer células de Rhesus tienen que contar con métodos de cultivo), la mayoría de laboratios que diagnostican virus están situados en instituciones estatales y en los grandes hospitales.

✓ 24.14 Revisión de conceptos

El cultivo de virus *in vitro* puede llevarse a cabo solamente en tejidos. Por lo tanto, la mayoría de las técnicas diagnósticas para la identificación vírica no dependen del crecimiento, sino que se basan en técnicas fiables de inmunoensayos e hibridación de ácidos nucleicos. Las técnicas de microscopía electrónica son útiles para la observación directa del virus en las muestras del hospedador.

- ✓ ¿Por qué deben crecer los virus en cultivos de tejidos y no en medios artificiales inertes?
- ✓ ¿Cómo pueden identificarse virus patógenos individuales?

Preguntas de repaso

1. Describa las técnicas estándar para obtener y cultivar bacterias de una muestra de sangre y de garganta. ¿Qué precauciones deben tomarse para las muestras de sangre?
2. ¿Por qué proceden las bacterias cultivadas de muestras de orina? ¿Por qué el *número* de células bacterianas en orina tiene mayor significación? ¿Qué organismo es responsable de la mayoría de las infecciones del tracto urinario?, ¿por qué?
3. Describa las técnicas utilizadas para el cultivo anaerobio de microorganismos. ¿Por qué es importante procesar rápidamente todas las muestras clínicas? ¿Qué técnicas y precauciones especiales se necesitan para el aislamiento y el cultivo de anaerobios?
4. Distinga entre medios *selectivos* y *diferenciales*. ¿El agar eosina-azul de metileno (EMB) es selectivo o diferencial? ¿Cómo y por qué se emplea en el laboratorio clínico?
5. Describa la prueba de Kirby-Bauer para la sensibilidad antibiótica. ¿Por qué deberían analizarse por este método los posibles patógenos procedentes de aislados de enfermos?
6. ¿Cómo se contrae la mayoría de las infecciones de laboratorio? ¿Qué medidas podrían tomarse para evitarlas?
7. ¿Por qué el título de anticuerpo *aumenta* tras la infección? ¿Por qué es necesario extraer dos muestras de suero (una en periodo agudo, otra en periodo de convalecencia) para monitorizar las infecciones? ¿Un alto título de anticuerpo es indicativo de infección? Explíquelo.
8. ¿Qué ventajas presentan los anticuerpos *monoclonales* sobre las preparaciones de anticuerpos *policlonales*, especialmente en lo que se refiere a la estandarización de las preparaciones de anticuerpos?
9. Describa una reacción de neutralización con respecto una toxina y un antisuero.

10. Las pruebas de aglutinación son significativamente más sensibles que las pruebas de precipitación. ¿A qué se debe esto?
11. Explique por qué los metales pesados se utilizan para visualizar virus y partículas subvíricas.
12. ¿Cómo se utilizan los anticuerpos fluorescentes en el diagnóstico de enfermedades víricas? ¿Qué ventajas tienen los anticuerpos marcados con fluorescencia sobre los que no están marcados?
13. Las pruebas de radioinmunoanálisis (RIA) y enzimoinmunoanálisis (ELISA) son muy sensibles comparadas con la aglutinación, ¿por qué?
14. ¿Por qué se utiliza la técnica de la inmunotransferencia (Western blot) para confirmar los resultados positivos del ELISA para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)?
15. ¿Qué información es esencial para el diseño de una sonda nucleotídica específica de antígeno? ¿Dónde se puede obtener dicha información? ¿Se dispone de información para todos los patógenos?
16. ¿Qué es una línea celular primaria? ¿Cuál es la razón por la que algunos virus animales crecen en cultivo de tejidos?

Ejercicios prácticos

1. A partir de un cultivo de sangre obtiene un cultivo positivo para *Staphylococcus epidermidis*. Interprete y explique los resultados ¿Es probable que el enfermo tenga una bacteriemia por *S. epidermidis*? ¿Por qué sí o por qué no?
2. Describa las características de la observación en microscopio y de cultivo que favorecerían un diagnóstico de gonorrea. ¿Por qué el agar Thayer-Martin es un medio más adecuado que el «agar chocolate» para el aislamiento de *Neisseria gonorrhoeae*?
3. Compare y contraste los cambios de color debidos a los indicadores de pH en las pruebas de fermentación de hidratos de carbono y de utilización del citrato. ¿Se emplea el mismo colorante en ambas pruebas? ¿Por qué sí o por qué no?
4. ¿Por qué no debería ser una práctica médica habitual tratar una enfermedad infecciosa con antibióticos antes de aislar el patógeno sospechoso? ¿Qué pasos posteriores deberían seguirse de la terapia antibiótica cuando ha sido aislado e identificado el patógeno, qué pasos pasteriores deben usarse para confirmar la sensibilidad al antibiótico? ¿Por qué es infrecuente seguir estos pasos fuera del ambiente hospitalario?
5. Como profesional que se acaba de incorporar a un laboratorio clínico, se le ha confiado la tarea de formalizar los requerimientos de seguridad en el laboratorio, para prevenir enfermedades infecciosas. Explique de qué forma monitorizaría y reforzaría las recomendaciones que se han descrito en la Sección 24.4.
6. Basándose en las consideraciones de la respuesta primaria y secundaria de anticuerpos (Sección 22.9), explique la posibilidad de coger una muestra en la infección aguda y otra en las 2 semanas después, en la recuperación. ¿Qué información pretende obtener del suero del paciente recuperado? ¿Qué clases de anticuerpos espera que haya en cada tiempo, asumiendo que el paciente no se ha expuesto antes a esa enfermedad?
7. ¿Cómo la administración de un antígeno influencia la sensibilidad o la especificidad de una muestra de anticuerpos policlonales?
8. En los ensayos de precipitación se forman complejos de antígeno y anticuerpo debido al exceso de anticuerpo o debido al exceso de antígeno, esto ocurre porque los reactivos no están en proporciones óptimas. ¿Es el exceso de antígeno o anticuerpo problemático para que se produzca la aglutinación? ¿Cuáles son las potenciales desventajas de los ensayos rápidos, basados en el no cultivo?
9. ¿Cuáles son las ventajas de los sistemas de identificación rápida, como es el caso de las pruebas de aglutinación, comparados con las técnicas de diagnóstico clínico? Exponga las posibles desventajas de las pruebas rápidas que no se basan en cultivos.
10. Diseñe un ensayo de anticuerpos fluorescentes para confirmar un diagnóstico inicial de «faringitis estreptocócica» (*Streptococcus pyogenes* es el agente etiológico de la faringitis estreptocócica). Exponga todos los aspectos del ensayo incluyendo la preparación de antisueros, los controles que se necesitan y la interpretación clínica.
11. Diseñe una prueba de ELISA para la detección del virus de la hepatitis A en heces (Sección 26.11). Diseñe también una prueba *indirecta* para la detección de la *exposición* al virus de la hepatitis A. Haga una lista con todos los reactivos de cada test y explique el fundamento de las diferencias entre directos e indirectos. ¿Puede un individuo ser positivo para ambos tests? ¿Por qué sí o por qué no?
12. ¿Cuáles son las principales ventajas de la utilización de sondas de DNA en microbiología diagnóstica? Exponga de dónde puede obtener información para diseñar sondas de análisis mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el virus de la hepatitis A de la pregunta 11.
13. Discuta la importancia de la *carga vírica* en el tratamiento y la progresión del SIDA.
14. Defina los tests para aislar un nuevo patógeno vírico. Esté seguro de incluir ensayos de crecimiento y ensayos moleculares. ¿Dónde daría sus resultados?

La epidemiología conlleva el estudio de las enfermedades emergentes. Los epidemiólogos deben estar alerta de la aparición de enfermedades poco communes como el carbunco, produccido por *Bacillus anthracis*, mostrado aquí. A través del trabajo de los epidemiólogos, los funcionarios de salud pública pueden facilitar el control de las enfermedades y planificar el control de las epidemias. También pueden evaluar y determinar si han sucedido de forma natural, o determinar si han sido consecuencia de bioterrorismo.

25

EPIDEMIOLOGÍA

I PRINCIPIOS DE EPIDEMIOLOGÍA 839
25.1 La epidemiología como ciencia 839
25.2 Terminología epidemiológica 840
25.3 Reservorios de la enfermedad y epidemias 842
25.4 Transmisión de enfermedades infecciosas 845
25.5 La comunidad de hospedadores 848

II EPIDEMIOLOGÍA 850
25.6 La epidemia de SIDA 850
25.7 Infecciones adquiridas en los hospitales (nosocomiales) 852

III EPIDEMIOLOGÍA Y SALUD PÚBLICA 854
25.8 Medidas de salud pública para el control de enfermedades 854
25.9 Consideraciones sobre la salud global 856
25.10 Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes 857
25.11 Guerra biológica (bioterrorismo) y armas biológicas 864

Glosario

Aguda infección de corta duración que se establece rápidamente y tiene una rápida recuperación

Brote aparición de un gran número de casos de una enfermedad en un corto periodo de tiempo

Crónica infección de larga duración

Cuarentena la práctica de restringir el desplazamiento de individuos con enfermedades altamente contagiosas, con el fin de evitar la difusión de la enfermedad

Endémica enfermedad constantemente presente, habitualmente en bajo número

Epidemia con origen común epidemia que resulta al infectarse un gran número de personas por una misma fuente de contaminación

Epidemia de persona a persona epidemia que resulta del contacto entre dos personas, caracterizada por una gradual elevación y descenso del número de casos

Epidémica aparición de una enfermedad en un número de personas muy elevado, en una región localizada

Epidemiología estudio de la incidencia, distribución y control de las enfermedades infecciosas

Fómites objetos inanimados que, si se contaminan con un patógeno viable, pueden transferir el patógeno al hospedador

Guerra biológica el uso de agentes biológicos para incapacitar o matar a los humanos

Incidencia el número de casos de enfermedad en una población

Infección nosocomial infección adquirida en el hospital

Infecciones emergentes enfermedades infecciosas que se cree que estan bajo control y vuelven a aparecer

Infecciones reemergentes enfermedades infecciosas cuya incidencia ha aumentado en los últimos 20 años o cuya incidencia amenaza con aumentar en un futuro próximo

Inmunidad de grupo resistencia de un grupo a un patógeno, como resultado de la inmunidad de una gran proporción de los miembros del grupo

Morbilidad incidencia de una enfermedad en una población

Mortalidad incidencia de muertes en una población

Pandemia epidemia de ámbito mundial

Portador individuo con una infección subclínica, que puede propagar una enfermedad

Prevalencia la proporción o porcentaje de individuos de una población que tienen una enfermedad

Reservorio sitios en los que permanecen los agentes infecciosos viables y a partir de los cuales puede ocurrir una infección

Salud pública la salud de la población en conjunto

Vector agente vivo que transfiere un patógeno (*véase* el otro uso de la palabra en el Capítulo 31)

Vehículo fuente inanimada de patógenos que infecta a gran número de individuos. Vehículos comunes son los alimentos y el agua

Vigilancia observación, reconocimiento y declaración de las enfermedades cuando aparecen

Zoonosis enfermedad que ocurre primordialmente en los animales, pero puede ser transmitida a las personas

I PRINCIPIOS DE EPIDEMIOLOGÍA

En este capítulo estudiamos cómo se difunde un patógeno desde un individuo infectado a otros de la población. Por tanto estamos refiriéndonos aquí a la *salud pública*. Los principios establecidos en este capítulo son fundamentales para controlar la difusión de la enfermedad infecciosa.

Una medida de nuestro éxito en el control de las enfermedades infecciosas es la que indican los datos presentados en la Figura 25.1, que compara las causas actuales de muerte en los Estados Unidos, con las existentes al comienzo del siglo veinte. Muchas enfermedades microbianas ya no representan el peligro para la salud pública que representaron en otra época en los países desarrollados. Sin embargo, algunas enfermedades infecciosas siguen siendo un importante problema para la salud pública, incluso en países desarrollados, y otras enfermedades infecciosas *nuevas* están emergiendo contínuamente.

En el mundo, las enfermedades infecciosas son responsables de casi el 30% del total de los 56 millones de muertes anuales calculadas. Como veremos, varias de estas enfermedades pueden ser prevenidas. Claramente, las enfermedades infecciosas seguirán siendo un importante problema de salud pública; incluso en Estados Unidos, las muertes por enfermedades infecciosas se están incrementando (Figura 25.1). La erradicación y el control eficaz de las enfermedades infecciosas requiere soluciones científicas, médicas, económicas, políticas y educativas.

25.1 La epidemiología como ciencia

Las enfermedades infecciosas afectan a individuos, pero las enfermedades no son adquiridas cuando los individuos no forman parte de una *población*. Por tanto, las enfermedades infecciosas se estudian en relación con sus efectos en las po-

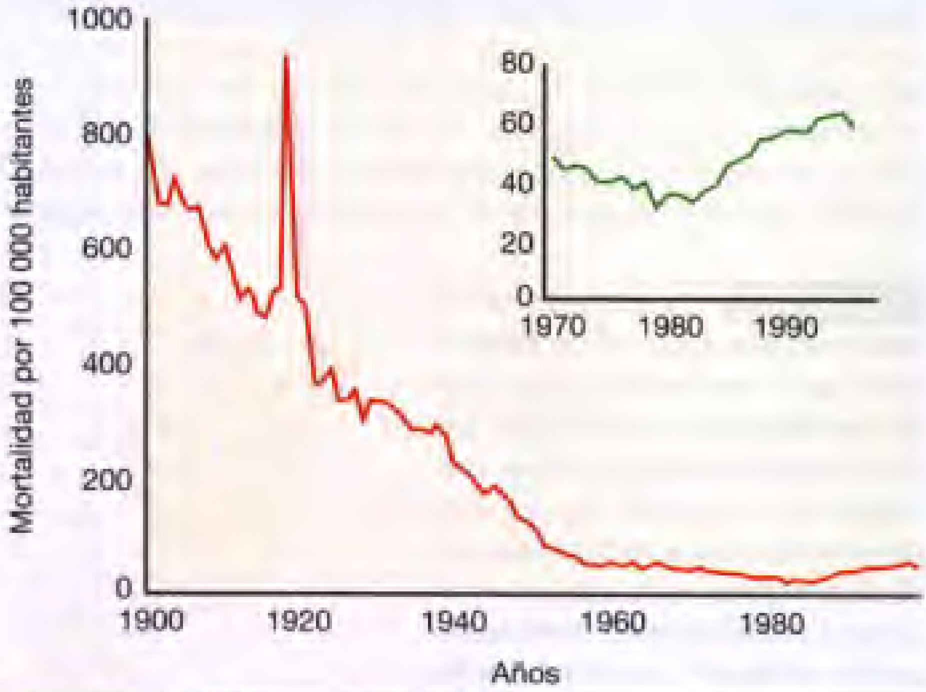


Figura 25.1 Muertes debidas a infecciones en Estados Unidos. Las enfermedades infecciosas han declinado a lo largo del siglo xx, excepto el gran número de muertes en 1918 y 1919, debidas a la pandemia de gripe; las muertes han sufrido un incremento significativo desde 1980. De Hughes, J. M. 2001. Emergencia de enfermedades infecciosas: una perspectiva CDC. *Emerg. Infecct Dis.* 17: 494-496.

blaciones. El estudio de la incidencia, distribución y control de las enfermedades en las poblaciones es el campo de la **epidemiología**.

Para seguir existiendo en la naturaleza, un patógeno debe ser capaz de crecer y multiplicarse. Por esta razón, un aspecto importante de la epidemiología de cualquier enfermedad es la consideración de la historia natural del patógeno. En muchos casos, el patógeno no puede crecer fuera del hospedador y si el hospedador muere, el patógeno morirá también. Por tanto, los patógenos que producen la muerte del hospedador antes de transmitirse a un nuevo hospedador, se extinguen. Esto plantea la cuestión de por qué los patógenos, en algunas ocasiones matan a sus hospedadores. De hecho, un parásito bien adaptado vive en sincronía con su hospedador, tomando sólo lo que necesita para su existencia y causando el mínimo daño. Sin embargo, con frecuencia se producen graves daños cuando surge un nuevo patógeno frente al cual el hospedador no ha desarrollado resistencia o cuando la resistencia del hospedador cambia a causa de una dieta pobre, edad y estrés (*véase* Sección 21.13). Los patógenos son fuerzas de selección en la evolución del hospedador, del mismo modo que los hospedadores son fuerzas selectivas en la evolución de los patógenos. Cuando existe un equilibrio entre el hospedador y el patógeno, ambos coexisten en una relación estable. Sin embargo, cuando el patógeno no depende del hospedador para sobrevivir, el patógeno puede causar una enfermedad devastadora. Por ejemplo, organismos del género *Clostridium*, habitantes ubicuos del suelo (*véase* Sección 12.20), ocasionalmente infectan a los humanos causando enfermedades tan graves como el tétanos y el botulismo (*véanse* Secciones 20.8, 27.8 y 29.5).

El epidemiólogo sigue la distribución de una enfermedad para identificar su origen y modo de transmisión. Los datos epidemiológicos se obtienen a partir de los estudios clínicos, revisiones e informes sobre la enfermedad, cuestionarios de seguros y entrevistas con pacientes, para definir los factores comunes que constituyen una enfermedad. Esto contrasta con el estudio de la enfermedad en la clínica o en el laboratorio, donde la finalidad es el tratamiento del paciente *individual*. El conocimiento de los aspectos tanto clínicos como ecológicos de una enfermedad determinada, es importante para establecer medidas de sanidad pública que sean efectivas en el control de la enfermedad.

✓ 25.1 Revisión de conceptos

La epidemiología sigue la difusión de las enfermedades en las poblaciones. El epidemiólogo desarrolla métodos para el control de la enfermedad infecciosa, definiendo las interacciones del patógeno con la población de hospedadores.

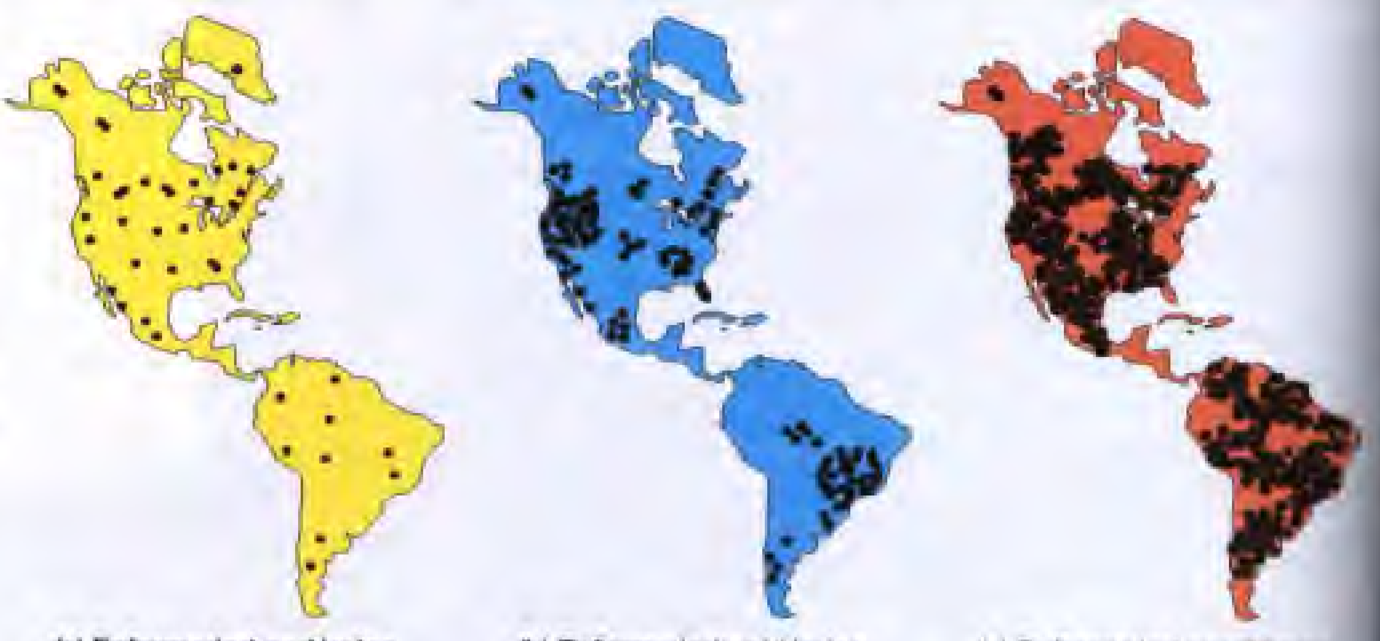
- ✓ ¿En qué se diferencia un epidemiólogo de un microbiólogo?
- ✓ ¿Por qué el epidemiólogo obtiene datos de las enfermedades infecciosas en una población?

25.2 Terminología epidemiológica

El epidemiólogo utiliza varios términos que tienen un significado específico. La **prevalencia** de una enfermedad en una población se define como la proporción o porcentaje de individuos de una población que padecen la enfermedad en un momento dado. La **incidencia** de la enfermedad es el número de individuos enfermos de una población en riesgo. Se dice que la enfermedad es **epidémica** cuando ocurre a un mismo tiempo en un número inhabitualmente alto de individuos de una comunidad; una **pandemia** es una epidemia ampliamente distribuída. (Figura 25.2). Por el contrario, una enfermedad **endémica** es aquella que está continuamente presente en una población, pero con poca incidencia. En una enfermedad endémica, el patógeno puede no ser muy virulento, o la mayoría de los individuos pueden ser inmunes, y también la incidencia de la enfermedad es baja. Sin embargo mientras dura una situación endémica, permenecen unos cuantos individuos que sirven de *reservorio* de la infección.

Ocurren casos *esporádicos* de la enfermedad cuando se registran casos individuales en zonas geográficamente separadas, lo cual implica que los casos no están relacinados. Un **brote** de la enfermedad tiene lugar cuando se observa un número de casos, generalmente en un corto periodo de tiempo, en una zona donde previamente sólo había casos esporádicos de la enfermedad. Por último, se emplea la expresión *infección subclínica* para describir lo que padecen individuos que no muestran síntomas o sólo síntomas muy leves. Los individuos infectados subclínicamente son identificados frecuentemente como **portadores** de una determinada enfermedad porque, aunque ellos muestran pequeños síntomas o ni siquiera los

Figura 25.2 Clasificación de las enfermedades según su incidencia. Cada punto representa varios casos de una determinada enfermedad. Las enfermedades endémicas están presentes en la población en una área determinada. Las enfermedades epidémicas muestran gran distribución en un área amplia, generalmente desde un foco endémico. Las enfermedades pandémicas muestran una distribución y no muestran un foco geográfico.



(a) Enfermedad endémica *(b)* Enfermedad epidémica *(c)* Enfermedad pandémica

muestran, todavía pueden estar transportando y diseminando activamente el agente patógeno (*véase* Sección 25.3).

Mortalidad y morbilidad

En la práctica, la incidencia y prevalencia de una enfermedad se determinan a partir de estadísticas de enfermedad y muerte. Con estos datos, se puede tener una imagen de la salud pública de una población. La población que se considera puede variar en cuanto a tamaño desde la población humana total hasta la población de una región localizada de una ciudad, estado o un país. La salud pública varía de una región a otra y también a lo largo del tiempo; por ello la evaluación de la salud pública en un momento dado es sólo la instantánea de la situación. Al seguir examinando las estadísticas de la salud a lo largo de muchos años, es posible evaluar determinadas políticas sanitarias que pueden influir sobre la incidencia de las enfermedades.

La **mortalidad** expresa la incidencia de *muertes* en la población. En 1900, las enfermedades infecciosas fueron la principal causa de muerte en los países desarrollados (Figura 1.7), en tanto que ahora tienen un significado mucho menor enfermedades no infecciosas como las enfermedades del corazón y el cáncer, que tienen mayor importancia. Sin embargo, la situación actual podría cambiar rápidamente si se interrumpiesen las medidas de sanidad pública; y de hecho no refleja la situación a nivel mundial. En los países en desarrollo, las enfermedades infecciosas siguen siendo la principal causa de muerte (*véanse* Tabla 25.1 y Sección 25.9).

La **morbilidad** se refiere a la incidencia de la enfermedad en las poblaciones e incluye tanto enfermedades mortales como las que no lo son. Las estadísticas de morbilidad definen claramente la salud de la población con más precisión que las estadísticas de mortalidad, porque algunas enfermedades que afectan a la salud de manera importante, sólo tienen una mortalidad baja. Las causas principales de enfermedad son muy diferentes de las principales causas de muerte. Las principales enfermedades son afecciones respiratorias agudas (por ejemplo, el catarro común) y afecciones agudas del sistema digestivo, que generalmente se deben a agentes infecciosos y son causa habitual de muerte en los países desarrollados.

Desarrollo de la enfermedad

En términos de síntomas clínicos, el desarrollo de una enfermedad aguda típica puede dividirse en varias etapas:

1. *Infección*: el organismo empieza a multiplicarse en el hospedador.
2. *Periodo de incubación*: el tiempo que transcurre desde la infección hasta la aparición de los síntomas de la enfermedad. Algunas enfermedades como la gripe (*véase* Sección 26.8), tienen periodos de incubación cortos, que se miden por días; otras como el SIDA, los tienen más largos, que se miden por años (*véase* Sección 26.14). El periodo de incubación de una determinada enfermedad está determinado por el tamaño del inóculo, la virulencia del patógeno, la resistencia del hospedador, y la distancia entre el sitio de entrada y el foco de la infección (*véase* Sección 21.8). Al final de la incubación aparecen los primeros síntomas, tales como el dolor de cabeza y la sensación de malestar.
3. *Periodo agudo*: la enfermedad está en su punto cumbre, con síntomas evidentes como fiebre y escalofríos.
4. *Periodo de declive*: los síntomas de la enfermedad van cediendo, generalmente después de un periodo de intensa sudoración y empieza a notarse una sensación de

Tabla 25.1 Enfermedades infecciosas a nivel mundial (1999)

Enfermedad	Muertes	Agentes infecciosos
Enfermedades respiratorias agudas[*, a]	4 000 000	Bacterias, virus, hongos
Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA)	2 700 000	Virus
Enfermedades diarréicas	2 200 000	Bacterias, virus
Tuberculosis[*]	1 700 000	Bacterias
Malaria	1 100 000	Protozoos
Sarampión[*]	875 000	Virus
Tétano[*]	377 000	Bacterias
Tos ferina[*]	295 000	Bacterias
Meningitis bacteriana[*]	171 000	Bacterias
Sífilis	153 000	Bacterias
Hepatitis (todos los tipos)[*, b]	124 000	Virus
Tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño)	66 000	Protozoos
Leishmaniasis	57 000	Protozoos
Chlamidia	16 000	Bacterias
Infecciones intestinales por nematodos	16 000	Gusano parásito
Esquistosomiasis	14 000	Gusano parásito
Dengue	13 000	Virus
Otras enfermedades comunicables	1 700 000	

Los datos representan valores calculados para el número de muertes en todo el mundo, ha habido 56 millones de todas las causas. Alrededor de 15,6 millones de muertes se deberion a enfermedades infecciosas, muchas de ellas en países en desarrollo. Fuente: Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.

[*] Enfermedades para las que hay vacunas.

[a] Para la gripe y *Streptococcus pneumoniae* hay vacunas, para los catarros no hay vacunas.

[b] Las vacunas están disponibles para enfermedades como la hepatitis A y B. No hay vacunas para otros tipos de hepatitis.

bienestar. La desaparición de los síntomas puede ser rápida (un día), en cuyo caso se dice que ha habido una *crisis*, o puede ser más lenta, a lo largo de varios días, en cuyo caso se dice que ha sido por *lisis*.

5. *Periodo de convalecencia*: el paciente recobra vigor y vuelve a la normalidad.

Durante las últimas etapas del ciclo de la infección, los mecanismos inmunitarios del hospedador se van haciendo cada vez más importantes y, en la mayoría de los casos, la recuperación total requiere y da como resultado una inmunidad activa.

✓ 25.2 Revisión de conceptos

Una enfermedad endémica está constantemente presenten bajo número en una población. En las epidemias se produce una incidencia de la enfermedad que habitualmente ocurre en una determinada población. Una infección puede causar morbilidad (enfermedad) o mortalidad (muerte), en una poblacion. La enfermedad sigue en el hospedador unas pautas clínicas predecibles.

- ✓ Diferencie entre una enfermedad endémica, una enfermedad epidémica y una pandemia.
- ✓ Distinga entre morbilidad y mortalidad. ¿Cómo la *morbilidad* del hospedador puede suponer una ventaja para el patógeno?
- ✓ ¿Cómo la *mortalidad* del hospedador puede ser una ventaja para el patógeno?

25.3 Reservorios de la enfermedad y epidemias

Los **reservorios** son sitios en los que agentes infecciosos viables permenecen vivos y a partir de los cuales puede surgir la infección de los individuos. Los reservorios pueden ser tanto animados como inanimados. La Tabla 25.2 ofrece una lista de algunas enfermedades humanas comunes y de sus reservorios. Algunos patógenos son primordialmernte *saprofitos* (viven a partir de materia muerta) y sólo incidentalmente infectan y causan enfermedad. Por ejemplo, *Clostridium tetani* (el agente etiológico del tétanos) habita normalmente en el suelo. La infección de los animales por este organismo es un acontecimiento accidental; para él no es esencial infectar un hospedador para continuar su existencia y, aún cuando no hubiera hospedadores susceptibles, *C. tetani* seguiría sobreviviendo en la naturaleza.

Sin embargo, muchos patógenos tienen otros organismos vivos como únicos reservorios. En estos casos, el reservorio es un componente esencial del ciclo de vida natural del agente infeccioso. Algunas infecciones sólo tienen lugar en seres humanos,y el mantenimiento del ciclo exige una transmisión de persona a persona (*véase* Capítulo 26). Este tipo de ciclo del patógeno es común en las enfermedades respiratorias víricas y bacterianas, en las enfermedades de transmisión sexual, en las infecciones estreptocócicas y estafilocócicas, la difteria, la fiebre tifoidea y las paperas. Como veremos, los patógenos que dependan de un solo hospedador pueden ser erradicados (*véase* Sección 25.8).

Zoonosis

Algunas enfermedades infecciosas que afectan a las personas también afectan a los animales. Una enfermedad que afecta principalmente a animales, pero que ocasionalmente se transmite a las personas se denomina **zoonosis**. Dado que las medidas veterinarias de sanidad para los animales están menos desarrolladas que las medidas sanitarias para las personas, la tasa de infección de algunas enfermedades es mucho más alta en animales y la transmisión de animal a animal es habitual. Sin embargo en ocasiones la transmisión es del animal a la persona. En tales enfermedades, la transmisión de persona a persona es poco probable. Por tanto, el mantenimiento del patógeno en la naturaleza depende de la transmisión de animal a animal. No obstante, el control de las zoonosis en las poblaciones humanas en modo alguno hace que dejen de ser un problema de salud pública. En efecto, en general suele lograrse un control más efectivo de la enfermedad eliminándola de los reservorios animales. Es notable el éxito logrado en el control de enfermedades que con frecuencia se transmitían a las personas desde los animales domésticos: la tuberculosis bovina, una enfermedad que las vacas afectadas de tuberculosis transmitían a los humanos. El control se logró principalmente identificando y eliminando los animales infectados. La pasteurización de la leche tuvo también una enorme importancia para evitar la transmisión de la tuberculosis bovina a las personas, dado que la leche era el principal vehículo de transmisión.

Ciertas enfermedades infecciosas tienen ciclos más complejos, que suponen la transferencia estricta desde el animal al hombre, y de éste al animal. Estas enfermedades se deben a organismos con ciclos de vida complejos como los protozoos (por ejemplo la malaria, *véase* Sección 27.5). En estos casos el control de la enfermedad en la población puede hacerse a través de las personas o bien a través del hospedador animal.

Portadores

Un portador es un individuo infectado sin síntomas claros de la enfermedad clínica. Los portadores son fuentes potenciales de infección para otros y son importantes para comprender la difusión de la enfermedad. Los portadores pueden ser individuos en periodo de incubación de la enfermedad, en cuyo caso el estado de portador precede al desarrollo de los síntomas. Los portadores de esta clase son fuentes primarias de agentes infecciosos para las infecciones respiratorias porque todavía no son conscientes de su infección y por ello no toman precauciones para no infectar a otros. Tales personas son **portadores agudos** porque el estado de portador dura sólo un corto periodo de tiempo. También son significativos desde el punto de vista de la sanidad pública los **portadores crónicos**, los cuales pueden permenecer infectados durante largos peroiodos de tiempo. Los portadores crónicos pueden ser individuos que parecen perfectamente saludables. Tuvieron una enfermedad clínica y se recuperaron, o bien pueden tener una infección subclínica que ha permenecido inaparente. Los portadores pueden identificarse por una serie de técnicas diagnósticas, técnicas der cultivo (*véase* Sección 24.1) o técnicas serológicas, (anticuerpos) (*véase* Sección 24.5). Por ejemplo, los

Tabla 25.2 Enfermedades epidémicas: Agentes, fuentes, reservorios y control

Enfermedad	Agente causal[a]	Fuentes de infección	Reservorios	Medidas de control
Epidemias con origen común[b]				
Carbunco	*Bacillus anthracis* (B)	Leche o carne de animales infectados	Ganado vacuno, porcino, cabras, ovejas, caballos	Destrucción de los animales infectados
Disentería bacilar	*Shigella dysenteriae* (B)	Contaminación fecal de los alimentos o el agua	Personas	Detección y control de portadores; revisión de los manipuladores de alimentos, descontaminación de los abastecimientos de agua
Botulismo	*Clostridium botulinum* (B)	Alimentos contaminados por el suelo	Suelo	Adecuada conservación de los alimentos
Brucelosis	*Brucella melitensis* (B)	Carne o leche de animales contaminados	Ganado vacuno, porcino, cabras, ovejas, caballos	Pasteurización de la leche; control de la infección en los animales
Cólera	*Vibrio cholerae* (B)	Contaminación fecal de los alimentos y agua	Personas	Descontaminación de fuentes públicas de agua
E. coli O157:H7 (infección alimentaria)	*Escherichia coli* O157:H7 (B)	Contaminación fecal de los alimentos y agua	Personas y vacas	Descontaminación de las fuentes públicas de agua; revisión de los manipuladores de alimentos; pasteurización de bebidas.
Giardiasis	*Giardia* spp. (P)	Contaminación fecal del agua	Mamíferos salvajes	Descontaminación de fuentes públicas de agua
Hepatitis	Hepatitis A, B, C, D, E (V)	Personas infectadas	Personas	Descontaminación de los fluídos y fómites contaminados; vacunación si se dispone de ella (A y B sólamente)
Legionelosis	*Legionella pneumophila* (B)	Agua contaminada	Ambientes húmedos	Descontaminación de los aires acondicionados y de las torres de aireación
Fiebre paratifoidea	*Salmonella paratyphi* (B)	Contaminación fecal de los alimentos y agua	Personas	Descontaminación de las fuentes públicas de agua; revisión de los manipuladores de alimentos; vacunación
Fiebre tifoidea	*Salmonella typhi* (B)	Contaminación fecal de los alimentos y agua	Personas	Descontaminación de las fuentes públicas de agua; revisión de los manipuladores de alimentos; pasteurización de la leche; vacunación
Epidemias de hospedador a hospedador				
Enfermedades respiratorias				
Difteria	*Corynebacterium diphtheriae* (B)	Casos humanos y portadores; alimento infectado y fómites	Personas	Vacunación; cuarentena de los individuos infectados
Síndrome pulmonar Hantavirus	Hantavirus (V)	Inhalación de contaminación fecal; contacto	Roedores	Control de la población de roedores y de la exposición a ellos
Fiebres hemorrágicas	Virus Ébola (V)	Fluidos corporales infectados	Desconocido	Cuarentena de los casos activos
Meningitis meningocócica	*Neisseria meningitidis* (B)	Casos humanos y portadores	Personas	Tratar a los expuestos, con sulfadiazina, para las cepas sensibles
Neumonía neumocócica	*Streptococcus pneumoniae* (B)	Portadores humanos	Personas	Tratamiento antibiótico; aislamiento de los casos durante el periodo de contagio
Tuberculosis	*Mycobacterium tuberculosis* (B)	Esputos de personas enfermas; leche contaminada	Personas y ganado vacuno	Tratamiento con isoniazida; pasteurización de la leche
Tos ferina	*Bordetella pertussis* (B)	Casos humanos	Personas	Vacunación; aislamiento de los casos
Rubeola	Virus de la rubeola (V)	Casos humanos	Personas	Vacunación; evitar el contacto entre individuos infectados y mujeres embarazadas

(continúa)

Tabla 25.2 Enfermedades epidémicas: Agentes, fuentes, reservorios y control *(continuación)*

Enfermedad	Agente causal[a]	Fuentes de infección	Reservorios	Medidas de control
Gripe	Virus de la gripe (V)	Casos humanos	Personas, animales	Vacunación
Sarampión	Virus del sarampión (V)	Casos humanos	Personas	Vacunación
Enfermedades de transmisión sexual[c]				
Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA)	Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	Fluidos corporales infectados, especialmente semen y sangre	Personas	Tratamiento con inhibidores de la replicación vírica (no curativo) (*véase* Sección 26.14)
Clamidias	*Chlamydia trachomatis* (B)	Secrecciones uretrales, vaginales y anales	Personas	Ensayos para ver el organismo durante las revisiones pélvicas de rutina; quimoioterapia a los portadores y contactos potenciales; seguimiento y tratamiento de los casos
Gonorrea	*Neisseria gonorrhoeae* (B)	Secrecciones uretrales y vaginales	Personas	Quimioterapia a los portadores y contactos potenciales; seguimiento y tratamiento de los casos
Sífilis	*Treponema pallidum* (B)	Exudado infectado y sangre	Personas	Identificación por pruebas serológicas; tratamiento antibiótico a los individuos seropositivos
Tricomoniasis	*Trichomonas vaginalis* (P)	Secrecciones uretrales, vaginales y de próstata	Personas	Quimioterapia a los individuos infectados y contactos
Enfermedades transmitidas por vectores				
Tifus epidémico	*Rickettsia prowazekii* (B)	Picadura de un piojo infectado	Personas, piojos	Control de la población de piojos
Enfermedad de Lyme	*Borrelia burgdorferi* (B)	Picadura de garrapata infectada	Roedores, ciervo, garrapatas	Evitar la exposición a garrapatas; tratar con antibióticos a los individuos infectados
Malaria	*Plasmodium* spp. (P)	Picadura del mosquito Anopheles	Personas, mosquitos	Control de la población del mosquito; tratar a las personas con drogas antipalúdicas
Peste	*Yersinia pestis* (B)	Picadura de pulga	Roedores salvajes	Control de las poblaciones de roedores; vacunación
Fiebre manchada de las Montañas Rocosas	*Rickettsia rickettsii* (B)	Picadura de garrapata infectada.	Garrapatas, conejos, ratones	Evitar exponerse a las garrapatas; tratar a los individuos infectados con antibióticos
Enfermedades transmitidas por contacto directo				
Psitacosis	*Chlamydia psittaci* (B)	Contacto con aves o excrementos de aves	Aves salvajes y domésticas	Evitar exponerse a aves; tratar a los individuos infectados con antibióticos
Rabia	Virus de la rabia (V)	Mordedura de carnívoro	Carnívoros salvajes y domésticos	Evitar las mordeduras de animales; vacunación de los manipuladores de los animales y de los individuos expuestos
Tularemia	*Francisella tularensis* (B)	Contacto con conejos	Conejos	Evitar el contacto con conejos; tratar con antibióticos a los individuos infectados

[a] B, Bacteria, V, virus, P, protozoo.

[b] Algunas enfermedades de origen común también pueden transmitirse persona a persona.

[c] Las enferemedades de transmision sexual pueden combatirse usando preservativos y por abstinencia sexual.

antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* para desvelar la hipersensibilidad retardada (exposición previa a la infección activa) son usados para definir el estado de tuberculosis (*véanse* Secciones 22.13 y 26.5).

Entre las enfermedades en las que los portadores son importantes se incluyen: la hepatitis (*véase* Sección 26.11), la tuberculosis (*véase* Sección 26.5) y la fiebre tifoidea (*véase* el recuadro «El trágico caso de Maria Tifoidea», *véase* Sección 25.3). A veces los controles de los manipuladores de alimentos y de los trabajadores sanitarios se hacen para detectar casos inaparentes de estas infecciones.

✓ 25.3 Revisión de conceptos

Para comprender cómo se desarrolla la enfermedad, debe conocerse el reservorio del patógeno. Algunos patógenos existen en el suelo, en el agua o en animales. Otros patógenos están restringidos a las personas y se transmiten únicamente por con-

Aprendiendo del pasado... El trágico caso de María Tifoidea

El clásico ejemplo de un portador crónico fué la mujer conocida como María Tifoidea (Mary Typhoid), una cocinera que trabajaba en la ciudad de Nueva York y en Long Island, a comienzos del siglo xx. Typhoid Mary (su nombre verdadero era Mary Mallon) estuvo empleada en varias casas de huéspedes e instituciones y, como cocinera, estaba en la posición clave para infectar a un gran número de personas. La investigación extensiva de un gran número de brotes de fiebre tifoidea, realizada por el Dr. George Soper, puso de manifiesto que Mary era la posible fuente de contaminación. Cuando se hizo el análisis bacteriológico de sus heces, tenía un elevado número de la bacteria *Salmonella typhi* causante de la fiebre tifoidea. Fué portadora durante muchos años, probablemente porque su vesícula biliar estaba infectada y los organismos se excretaban continuamente desde allí a su intestino. Las autoridades sanitarias le ofrecieron la posibilidad de eliminar la vesícula biliar, pero ella rechazó la operación y para evitar que continuase siendo una fuente de contaminación, fué llevada a prisión. Después de casi tres años recluída, fué liberada, con el compromiso de que no volvería a cocinar ni a manipular alimentos para otras personas y que se presentaría a las autoridades sanitarias cada tres meses. Desapareció rápidamente, cambió su nombre y estuvo de cocinera en hoteles, restaurantes y sanatorios, dejando tras de sí una estela de fiebre tifoidea. Al cabo de cinco años, fué capturada como resultado de la investigación de una epidemia que ocurrió en un hospital de Nueva York. De nuevo fué arrestada y conducida a prisión y permaneció bajo custodia en la isla de North Brother en el río East de la ciudad de Nueva York, durante 23 años. Murió en 1938, 32 años después de haber descubierto el epidemiólogo que ella era un portador crónico de fiebre tifoidea. ■

tacto directo de persona a persona. Para controlar una enfermedad es muy importante conocer los ciclos de vida de los patógenos y los portadores.

- ✓ ¿Qué es un *reservorio de la enfermedad*?
- ✓ Diferencie entre portadores *agudos* y *crónicos*

25.4 Transmisión de enfermedades infecciosas

Los epidemiólogos siguen la incidencia de una enfermedad correlacionando la distribución geográfica, estacional y los grupos de edad con los posibles modos de transmisión. Una enfermedad limitada a un localidad geográfica puede sugerir un vector particular; la malaria, por ejemplo, se transmite por un mosquito que se encuentra principalmente en regiones tropicales. Una marcada estacionalidad de una enfermedad, con frecuencia indica ciertos mecanismos de transmisión; como en el caso de la gripe en las que el número de casos se eleva rápidamente cuando los niños van al colegio y están en estrecho contacto.

Los diferentes patógenos tienen diferentes modos de transmisión que generalmente están relacionados con los hábitat de los organismos en el cuerpo. Por ejemplo, los patógenos respiratorios generalmente se transmiten por el aire, mientras que los patógenos intestinales se transmiten a través de los alimentos o el agua. Si el patógeno ha de sobrevivir, debe someterse a la transmisión de un hospedador a otro. Incluso los factores ambientales pueden ser importantes la supervivencia del patógeno; para otras variables como el clima pueden influir sobre la exposición a un patógeno. Por ejemplo, la encefalitis californiana causada por un virus RNA de cadena sencilla (Bunyavirus) (*véase* Sección 16.8) es más frecuente en verano y en otoño, y desaparece en invierno en un ciclo predecible (Figura 25.3). El virus se transmite por los mosquitos que, por supuesto, son más frecuentes en los meses cálidos. La desaparición del insecto vector hace que la

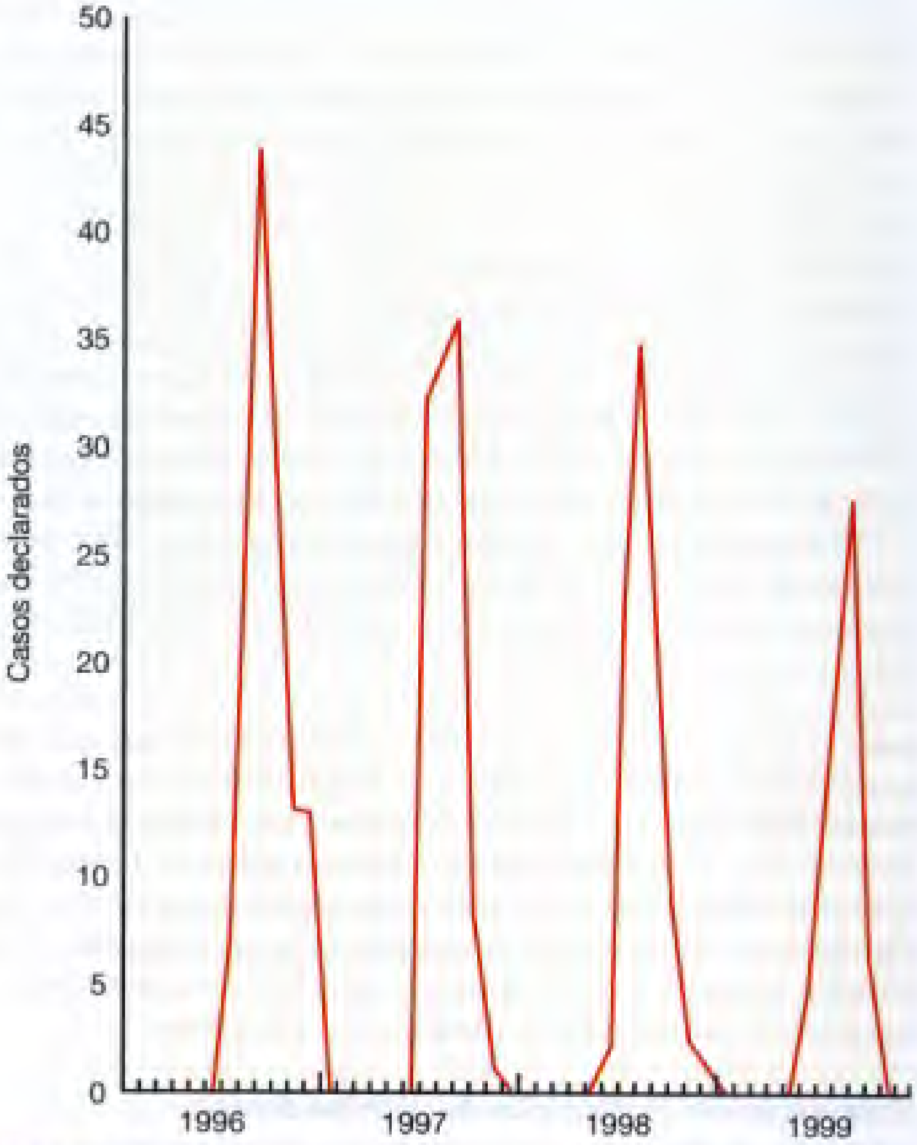


Figura 25.3 La incidencia de encefalitis californiana, una enfermedad vírica transmitida por mosquitos, en los Estados Unidos, por meses. Note el increíble aumento que se produce en verano, seguido de un descenso inceible en invierno. La enfermedad sigue el ciclo del mosquito. Los datos pertenecen a centro para el control de enfermedades infecciosas y prevención, Atlanta, GA, USA. Las enfermedades transmitidas por mosquitos siguen el mismo patrón de evolución, incluida la encefalitis equina oriental (del este), encefalitis de Saint Louis (MO) y la enfermedad del oeste del Nilo (West Nile).

enfermedad desaparezca, hasta que el mosquito reaparece en verano. Por tanto, los patógenos generalmente están asociados a características o mecanismos específicos que permiten asegurar la transmisión. La transmisión implica tres etapas: (1) salida del hospedador, (2) transmisión y (3) entrada en el nuevo hospedador. Ofrecemos ahora una rápida visión de conjunto de los mecanismos de transmisión.

Transmisión directa de hospedador a hospedador

La transmisión de hospedador a hospedador tiene lugar siempre que un hospedador infectado transmite la enfermedad a un hospedador susceptible. La transmisión por vía respiratoria y por contacto directo es muy común. La transmisión por gotículas infectivas es el medio más frecuente por el que se propagan las infecciones de las vías respiratorias altas, tales como el catarro común y la gripe. Sin embargo algunos patógenos son tan sensibles a las influencias ambientales que son incapaces de sobrevivir durante periodos de tiempo significativos fuera del hospedador y deben transmitirse de hospedador a hospedador por contacto directo. Los mejores ejemplos de patógenos tranmitidos por esta vía son los responsables de las enfermedades de transmisión sexual, tales como *Treponema pallidum* (sífilis) y *Neisseria gonorrhoeae* (gonorrea). Estos agentes son extremadamente sensibles a la desecación y no sobreviven fuera del cuerpo ni siquiera durante unos momentos. El contacto íntimo de persona a persona, como al besarse o durante la actividad sexual, proporciona un medio directo de transmisión para estos patógenos. No obstante, esta transferencia íntima sólo puede ocurrir si el patógeno viable está presente en la persona transmisora, en el sitio del cuerpo que se pone en contacto con la persona receptora. Por ello los patógenos causantes de las enfermedades de transmisión sexual viven en los genitales, la boca o el ano, porque éstos son los sitios implicados en el contacto sexual.

El contacto directo también está implicado en la transmisión de patógenos de la piel, tales como estafilococos (diviesos y granos) y algunos hongos (tiñas). Sin embargo estos patógenos son relativamente resistentes a las condiciones ambientales, tales como la sequedad, y el contacto íntimo entre dos personas no es el único mecanismo de transmisión. Muchos patógenos respiratorios se transmiten también por vía directa porque se dispersan en las gotículas que se desprenden al estornudar o al toser. No obstante muchas de estas gotículas no permanecen mucho tiempo y no son capaces de transmitir la enfermedad. Por tanto la transmisión requiere un estrecho, aunque no necesariamente íntimo, contacto entre dos personas.

Transmisión indirecta de hospedador a hospedador

La transmisión indirecta puede ocurrir tanto a través de seres vivos como de seres inanimados. Los agentes vivos que transmiten patógenos se denominan **vectores**; generalmente son artrópodos (por ejemplo insectos, ácaros), o vertebrados (por ejemplo perros, roedores) (*véase* Capítulo 27). Los artrópodos vectores pueden ser hospedadores de la enfermedad, pero simplemente transportan el agente de un hospedador a otro. Un gran número de artrópodos toman su alimento al picar y, si el patógeno está presente en la sangre, el artrópodo vector puede ingerir el patógeno y transmitirlo al picar a otro individuo. De hecho, en algunos casos el patógeno se multiplica dentro del artrópodo, que en ese caso se considera como hospedador alternante. Esta replicación conduce a la producción de inóculo, aumentando la probabilidad de que la próxima picadura conduzca a la infección.

Objetos inanimados, como las ropas de cama, los juguetes, los libros y los instrumentos quirúrgicos, también pueden transmitir la enfermedad. Estos objetos inanimados se conocen generalmente como **fómites**. Los alimentos y el agua se dice que son **vehículos** de la enfermedad. Los fómites pueden ser también vehículos de la enfermedad, pero las epidemias importantes originadas a partir de una fuente única suelen estar generalmente relacionadas con los alimentos o el agua, porque ambos son consumidos en gran cantidad por un número de personas de una población (*véanse* Capítulos 28 y 29).

Las epidemias

Se pueden distinguir dos tipos principales de epidemias : las que tienen una **fuente común** y aquellas en las que la enfermedad se transmite **de persona a persona.** En la Figura 25.4 se muestran las diferencias entre ambos tipos. Una **epidemia con un origen común** surge como resultado de una infección (o intoxicación) de un gran número de personas a partir de

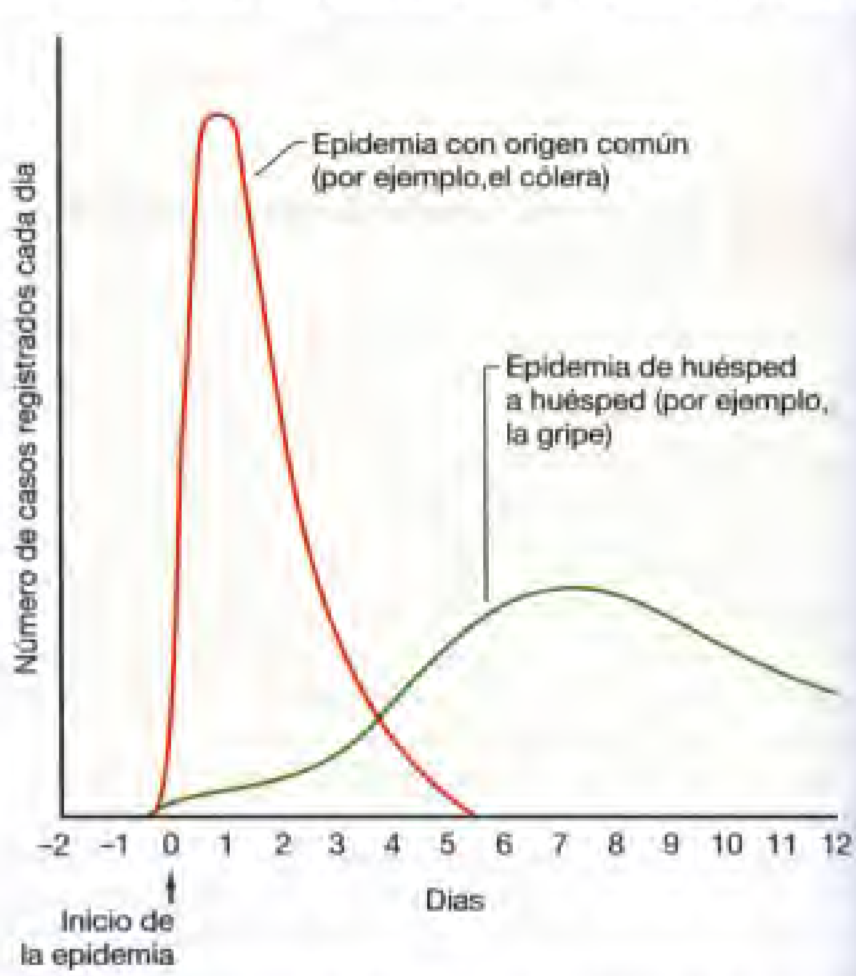


Figura 25.4 Orígenes de las epidemias. La forma de la curva de la epidemia ayuda a distinguir su posible origen. En una epidemia con una fuente común, tal como el agua o alimentos contaminados, la curva se caracteriza por una abrupta subida hasta llegar al máximo y una rápida bajada que es menos abrupta que la subida. Se continúa registrando casos durante un periodo aproximadamente igual a la duración de un periodo de incubación de la enfermedad. En una epidemia de hospedador a hospedador, la curva se caracteriza por una subida lenta y progresiva, y los casos continuan registrándose durante un periodo de tiempo equivalente a varios periodos de incubación de la enfermedad.

Aprendiendo del pasado... Snow y el cólera

La importancia del agua de bebida como vehículo para la difusión del cólera fue demostrada por primera vez en 1855, por el médico John Snow, quien en aquella época no tenía conocimiento de que la causante del cólera era una bacteria. El estudio de Snow es uno de los trabajos clásicos de la epidemiología y sirve de modelo para ver como un estudio cuidadoso puede conducir a conclusiones claras y llenas de significado.

En Londres, los abastecimientos de agua a las diferentes partes de la ciudad procedían de distintas fuentes y se conducían de distintas maneras. En una amplia zona del sur del río Támesis, que comprendía la Abadía de Westminster y el edificio del Parlamento, abastecían de agua a las casas dos compañías privadas que competían estre sí, la Southwark and Vauxhall Company y la Lambeth Company. El agua suministrada por la primera compañía era el principal vehículo de transmisión del cólera. Cuando Snow empezó a sospechar del abastecimiento de agua de la Compañía Southwark and Vauxhall, hizo una cuidadosa revisión de cada una de las casas de este distrito en donde había muerto alguien de cólera y determinaba cual era la compañía que suministraba el agua a esa residencia. En algunas partes de la zona, servidas por estas dos compañías, cada una de ellas tenía un monopolio, pero en una gran parte de la zona las dos compañías competían directamente, y cada una poseía tuberías independientes a lo largo de varias calles. Las casas tenían la opción de conectar con una u otra compañía y la distribución de las casas entre ambas se hacía al azar. Los resultados tajantes obtenidos por los estudios de Snow fueron totalmente convincentes, incluso para aquellos que se mostraban escépticos acerca de la importancia del agua contaminada, en la transmisión del cólera. En las primeras siete semanas de la epidemia, hubo 315 muertes en 10 000 casas suministadas por la compañía Southwark and Vauxhall y sólamente 37 entre 10 000 casas que recibían el agua de la Lambeth Company. En el resto de Londres se producían 59 muertes por cada 10 000 casas, lo cual mostraba que las casas que recibían el agua de la Lambeth, tenían menos muertes que la población en general. En los distritos en los que cada compañía tenía derechos exclusivos, podría arguirse, por supuesto, que no era el agua sino algún otro factor (suelo, aire, distribución general de las casas, etc) el que podía haber sido responsable de las diferencias en la incidencia de la enfermedad, pero en los distritos en los que competían ambas compañías, todos los demás factores eran los mismos, aunque la incidencia era elevada en las casas abastecidas por Southwark and Vauxhall y baja en las que recibían el agua de la Lambeth Company. Snow intentó relacionar estas diferencias en la incidencia de la enfermedad con las fuentes de agua utilizadas por las dos compañías. Como sospechaba que los excrementos y evacuaciones de los enfermos de cólera eran altamente infecciosos, consideró que podía existir una contaminación del abastecimiento de agua con aguas residuales. En aquellos días no se hacía ningun tratamiento de aguas residuales y se vertían directamente al río Támesis. La compañía Southwark and Vauxhall tenía su abastecimiento de agua en la margen derecha del Támesis, en el corazón de Londres, en donde podía tener lugar la contaminacón con las aguas residuales, en tanto que la compañía Lambeth obtenía su agua de un punto del río situado considerablemente lejos, por encima de la ciudad, y por ello estaba relativamente libre de polución. Era esta diferencia en la situación de la fuente, lo que explicaba las diferencias en la incidencia de la enfermedad. En palabras de Snow:

> Dado que no existen diferencias ni en las casas, ni en la gente que recibe el suministro de agua de las dos compañías, ni en las condiciones físicas del entorno, resulta obvio que no podría haberse diseñado un experimento que mostrase con más exactitud que éste, el efecto del abastecimiento del agua en el avance de la epidemia de cólera. Este experimento, además, se hizo a la mayor escala posible. No menos de trescientas mil personas de ambos sexos, de todo tipo de edad y ocupación y de todo rango y clase social, desde los más ricos a los más pobres, se dividieron en dos grupos sin que ellos lo eligieran y en la mayoría de los casos, sin su conocimiento; un grupo recibió agua que contenía restos de las cloacas de Londres y en ella lo que podía proceder de los pacientes de cólera, y el otro grupo recibía agua bastante libre de estas impurezas.

una fuente común contaminada, tal como un alimento o el agua. Generalmente una contaminación de este tipo se produce a causa del mal funcionamiento de las medidas higiénicas en el sistema central de distribución. Las enfermedades transmitidas por los alimentos o por el agua son principalmente enfermedades intestinales; el patógeno abandona el cuerpo con la materia fecal, contamina el alimento o el agua debido a prácticas sanitarias inapropiadas, y luego penetra en el tracto intestinal del receptor durante la ingestión. Dado que las enfermedades transmitidas por alimentos o por el agua son las más fáciles de controlar con medidas de sanidad pública, las estudiaremos con más detalle en los Capítulos 28 y 29 (*véanse* también los recuadros «Snow y el cólera» y «El trágico caso de María Tifoidea», en este capítulo). La incidencia de la enfermedad en un brote con una fuente común se caracteriza por una rápida elevación hasta un máximo, debido a que un gran número de individuos ingiere alimentos y agua contaminados en un periodo relativamente corto de tiempo (Figura 25.4). El brote con una fuente común también desaparece rápidamente, aunque la disminución es menos rápida que la subida. Se están declarando casos durante un periodo de tiempo aproximadamente igual a la duración del periodo de incubación de la enfermedad.

En una **epidemia de hospedador a hospedador**, la incidencia de la enfermedad presenta una elevación progresiva relativamente lenta (Figura 25.4) y una disminución gradual. Se siguen registrando casos a lo largo de un periodo de tiempo equivalente a varios periodos de incubación de la enfermedad. La epidemia puede haberse iniciado por la aparición de un único individuo infectado en una población susceptible y este individuo puede haber infectado a uno o más individuos de la población. El patógeno se multiplica luego en los individuos susceptibles, alcanza una etapa en la que puede transmitirse y es transferido a otros, donde se multiplica y de nuevo se transmite. La Tabla 25.2 resume algunas de las características epidemiológicas clave de algunas de las principales enfermedades epidémicas observadas actualmente.

✓ 25.4 Revisión de conceptos

Un patógeno puede transmitirse directamente de un hospedador a otro, o indirectamente por medio de otro agente vivo llamado vector u objetos innanimados (fómites) y por vehículos comunes como los alimentos o el agua. Las epidemias pueden originarse a partir de una fuente común o de hospedador a hospedador.

- ✓ Compare una *epidemia de origen común* con una *epidemia de hospedador a hospedador*. Cite al menos un ejemplo de cada una de ellas.
- ✓ Sugiera un método para detener la expansión de una epidemia de origen común y una de hospedador a hospedador.

25.5 La comunidad de hospedadores

La colonización por un parásito de un hospedador susceptible no inmunizado, puede conducir, en primer lugar, a una infección explosiva y a una epidemia. Sin embargo a medida que la población de hospedadores desarrolla una resistencia, se va controlando la dispersión del parásito y llega un momento en el que se alcanza un *equilibrio* entre el parásito y el hospedador. En un caso extremo, un fallo en el equilibrio puede conducir a la muerte y potencial desaparición de los hospedadores. Si el patógeno no tiene otro hospedador, podría ocasionar la extinción del patógeno. La evolución del patógeno se mide por el establecimiento del equilibrio con el hospedador, que conlleva la no destrucción del hospedador. La realidad es que el parásito y el hospedador influyen uno sobre la evolución del otro; es decir, que hospedador y parásito *coevolucionan*.

Coevolución de un hospedador y un parásito

Un excelente ejemplo experimental de coevolución de hospedador y parásito tuvo lugar cuando, intencionadamente, se introdujo un virus para controlar las poblaciones de conejos salvajes en Australia.

Los conejos salvajes se introdujeron en Australia en 1859, procedentes de Europa, y rápidamente se propagaron hasta llegar a invadir grandes áreas del continente. El Myxoma virus, (N. del R.: virus de la mixomatosis, virus DNA del género *Leporipoxvirus*, familia *Poxviridae*) fue descubierto en conejos sudamericanos que pertenecen a una especie diferente de la de los conejos europeos que había en Australia. En América del Sur el virus y su hospedador están aparentemente en equilibrio y el virus sólo causa una enfermedad leve. Sin embargo, el mismo virus es extremadamentre virulento en el conejo europeo y casi siempre causa una infección mortal. El virus pasa de conejo a conejo por las picaduras de los mosquitos y otros insectos, y es capaz de extenderse rápidamente en zonas donde están los insectos vectores adecuados.

El Myxoma virus fué introducido en Australia en 1950 para controlar la población de conejos. En unos meses el virus se había establecido bien en la población y se dispersó por una zona de Australia tan grande como toda la Europa occidental. La enfermedad presentaba una pauta estacional muy marcada, elevándose el máximo en verano, cuando los mosquitos vectores estaban presentes y disminuyendo en invierno. La epidemiología del Myxoma virus fue estudiada por los científicos australianos como modelo de una epidemia inducida por un virus. Se aisló el virus de los conejos salvajes y las cepas aisladas se caracterizaron en cuanto a su virulencia para los conejos de laboratorio. Al mismo tiempo se recogieron gazapos de sus madrigueras antes de que pudiera tener lugar la infección y se llevaron al laboratorio. Posteriormente estos conejos salvajes se exponían a cepas estándar virulentas del virus de la myxomatosis para determinar su susceptibilidad. Los resultados de este modelo de estudio se presentan en la Figura 25.5.

Durante el primer año de la epidemia más del 95% de los conejos infectados murieron. Sin embargo, al cabo de 6 años tanto la población del virus como la de los conejos habían cambiado. Durante este tiempo la mortalidad de los conejos bajó hasta el 84% aproximadamente y el virus aislado tenía una menor virulencia. Además se advirtieron cambios en la resistencia del conejo. En algunas partes de Australia donde primero se introdujo el virus, la población de conejos que quedaba había estado sometida a una presión selectiva por parte del virus durante varios años, con el paso de los años la resistencia de los conejos había ido aumentando de manerta espectacular (Figura 25.5). Esta resistencia fue debida a cambios genéticos adquiridos en la población de conejos y no a respuestas inmunológicas, ya que los conejos habían sido retirados de sus madres al nacer y nunca habían estado en contacto con el virus. Su resistencia se debía a algún cambio genético que les hacía menos susceptible al virus de la myxomatosis.

Como resultado de la introducción del virus de la myxomatosis se controló la población de conejos australianos, pero los cambios genéticos en el virus y en el hospedador impedían la completa erradicación del conejo en Australia. Los conejos supervivientes adquirieron factores de resistencia y en los años 1980 la población de conejos de Australia se acer-

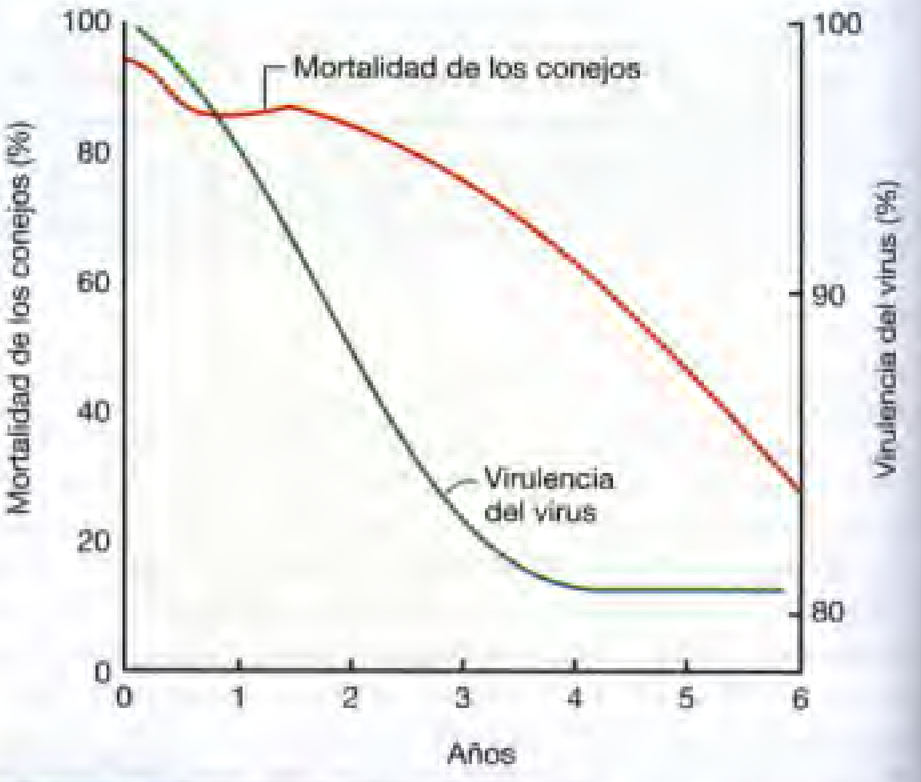


Figura 25.5 Cambios en la virulencia del Myxoma virus y en la susceptibilidad del conejo australiano, durante los años posteriores a la introducción del virus en Australia, en 1950. La virulencia del virus se expresa como promedio de mortalidad en conejos estándar de laboratorio, debida a virus recuperados del campo cada año. La susceptibilidad del conejo se determinó recogiendo conejos jóvenes de sus madrigueras y enfrentándolos a cepas de virus de virulencia moderadamente alta, que mataban al 90-95% de los conejos normales de laboratorio.

caba a los valores antes de la myxomatosis, con la destrucción del medio ambiente y presión sobre plantas y animales. Como resultado, las autoridades de Australia empezaron en 1995 la liberación de otros parásitos del conejo, el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV), un miembro de la familia *Calciviridae*, un virus RNA de cadena sencilla de polaridad positiva (*véase* Sección 16.9). Este virus se liberó en 80 sitios distintos por inoculación directa de conejos; hasta unas 280 liberaciones controladas. Debido a que el RHDV se transmite rápidamente por contacto directo entre los conejos y mata a los conejos 3 días después de la infección, las autoridades pensaron que la infección se autolimitaría, matando toda la población local de conejos. Pensaron que se establecería un equilibrio del hospedador y el virus, y se podrían controlar con mayor fiabilidad que los virus de la myxomatosis que se transmitían por artrópodos vectores; las poblaciones de conejos resistentes no debían aumentar y se extenderían rápidamente en el ambiente salvaje. Sin embargo, aunque los primeros resultados indican que el RHDV inicialmente fue muy efectivo reduciendo las poblaciones locales de conejos, se han detectado poblaciones de conejos resistentes al virus, lo que sugiere que se está produciendo una coevolución entre el virus y el hospedador. Parece ser que la estregia de liberar el RHDV está funcioanado rápidamente en la reducción de la población de conejos, pero también puede coevolucionar con el hospedador, como en el caso de la mixomatosis, perdiendo la letalidad y la habilidad para controlar la población de conejos.

Mientras que la coevolución entre el patógeno y el hospedador puede ser la norma para las enfermedades que se transmiten de hospedador a hospedador, para aquellos patógenos que no se transmiten de esta forma, como en el caso anteriormente mencionado de *Clostridium* spp. (*véase* Sección 25.1), no hay una selección que disminuya la virulencia y permita una mutua coexistencia. Los patógenos que se transmiten por vectores, como la picadura de artrópodos o garrapatas, también están bajo una presión no evolutiva para no comprometer (o no matar) al hospedador humano. Mientras el vector pueda conseguir la sangre antes que el hospedador muera, el patógeno puede mantener un alto nivel de virulencia diezmando la población humana en cada infección. Por ejemplo, el parásito de la malaria *Plasmodium* spp. muestra variaciones antigénicas en las proteínas de la envoltura, evitando así la reacción inmnunológica del hospedador. Esta habilidad genética para evitar las respuestas del hospedador *incrementa* la virulencia dentro de ese hospedador específico.

Otra prueba del fenómeno del continuo aumento de la virulencia proviene del estudio de las enfermedades infecciosas diarreicas en los recién nacidos. En hospitales, *Escherichia coli* puede causar diarreas muy severas e incluso la muerte, y la virulencia parece incrementarse por cada paso del patógeno a través del paciente hospitalario. *E. coli* se multiplica en el hospedador y es transportado por el personal sanitario o por fómites, por la ropa de cama y los muebles a otro paciente. Incluso si el paciente muere y no puede entrar en contacto con otro paciente para transmitirle la enfermedad, las cepas virulentas de *E. coli* infectan a otras personas por otra vía que no sea de persona a persona. Medidas extraordinarias como el lavado del personal sanitario y el lavado de lo muebles con desinfectantes pueden ser necesarias a fin de detener el ciclo de infección por cepas muy virulentas.

Inmunidad de grupo

Un análisis del estado inmunitario de un grupo es de gran importancia para entender la función de la inmunidad en el desarrollo de las epidemias. La **inmunidad de grupo** es la resistencia de un grupo a la invasión y dispersión de un agente infeccioso, que resulta de la inmunidad de una gran proporción de los miembros del grupo. Si la proporción de individuos inmunes es suficientemente alta, toda la población quedará protegida. La proporción de individuos resistentes necesaria para evitar una epidemia es más elevada para un agente muy virulento o para uno con un periodo de infectividad muy largo, y más baja si se trata de un agente poco virulento o con un periodo de infectividad corto.

La proporción de la población que debe ser inmune para evitar la infección del resto de la población puede calcularse a partir de los datos sobre la inmunización frente al poliovirus, en los Estados Unidos. Según los estudios epidemiológicos sobre la incidencia del poliovirus en grandes poblaciones, resulta que si el 70% de la población está inmunizada, la polio estará esencialmente ausente de esa población. Está claro que estos individuos inmunizados protegen al resto de la población porque no pueden adquirir ni transmitir la infección, por lo tanto rompen el ciclo de la infección (Figura 25.6). En

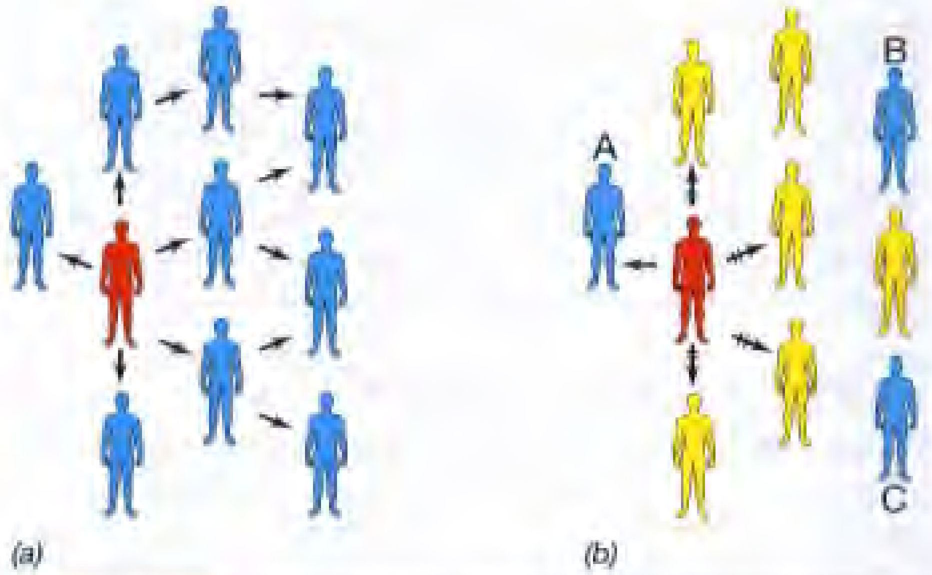


Figura 25.6 Inmunidad de grupo y transmisión de la enfermedad. La inmunidad de los individuos protege a los no inmunizados de la infección. (a) En una población desprotegida y un individuo infectado (rojo) puede infectar con éxito (flechas) a los individuos susceptibles (azules). Los individuos infectados *de novo* se vuelven transmisores de la enfermedad a individuos susceptibles. (b) Para el caso de *Corynebacterium diphteriae* (difteria) un patógeno de patogeneidad moderada en una población de densidad moderada el individuo infectado (rojo) no puede transmitir la enfremedad a los individuos susceptibles, porque los individuos resitentes (amarillo), inmunes en virtud de una exposición previa o inmunización, rompen el ciclo de la transmision de patógeno. Incluso si el individuo susceptible A (azul) adquiere la enfermedad, los otros individuos susceptibles B y C son protegidos. Para un patógeno de patogenicidad moderada como *C. diphteriae*, 70% de inmunidad confiere resistencia a una población. Para patógenos de alta transmisibilidad como varicela (Sección 26.7), niveles más elevados de inmunidad, del orden del 90% son necesarios para prevenir la transmision.

el caso de una enfermedad altamente infecciosa como la gripe, la proporción de individuos inmunes necesaria para conferir inmunidad de grupo es más elevada, alrededor del 90-95%. Para la difteria se ha calculado una cifra del 70%, pero estudios posteriores sobre pequeños brotes de difteria han mostrado que en áreas de alta densidad de población, para evitar el desarrollo de una epidemia, debe inmunizarse a una mayor proporción de la población. Aparentemente, en las poblaciones densas la transmisión de persona a persona puede ocurrir aunque el agente no sea altamente infeccioso. En el caso de la difteria, surge una complicación adicional porque las personas inmunizadas pueden albergar todavía al patógeno (infección inaparente) y de este modo actuan de portadores crónicos.

Ciclos de la enfermedad

Los conceptos de epidemias propagadas y de inmunidad de grupo pueden explicar también por qué ciertas enfermedades ocurren en *ciclos*. Un buen ejemplo de enfermedad cíclica es la varicela, que ocurre en una gran proporción de niños escolares. Dado que el virus de la varicela (*véase* Sección 16.13) se transmite por via respiratoria (*véase* Sección 26.7), su infectividad es alta en situaciones de aglomeración de gente, como en las escuelas. Al entrar a la escuela a la edad de 5 años la mayoría de los niños son susceptibles, por lo cual la introducción del virus en la escuela da como resultado una epidemia que se propaga de forma explosiva. Prácticamente todos los individuos se infectan y desarrollan inmunidad y, cuando se ha constituído una población inmune, la enfermedad desaparece. La varicela muestra un ciclo anual, probablemente porque cada año llega un nuevo grupo de niños que no son inmunes. La fase de aparición de la epidemia se relaciona con la época del año en la que empiezan las clases, a princios de otoño. En esta situación, un solo niño infectado puede iniciar una epidemia en todos los chicos que no hayan entrado en contacto con el patógeno o que no estén vacunados.

✓ *25.5 Revisión de conceptos*

Los hospedadores y los patógenos coevolucionan con el tiempo y llegan a una situación estable que favorece la continuada supervivencia de ambos. Con la inmunidad de grupo, una gran fracción de la población es inmune a una determinada enfermedad y es difícil que esa enfermedad se extienda. Los ciclos de la enfermedad se producen cuando se expone al patógeno una poblacion grande, recurrente y no inmune, como la de los niños que entran a la escuela

- ✓ Explique la coevolución de un huésped y un patógeno. Cite un ejemplo específico.
- ✓ ¿Cómo funciona la inmunidad de grupo para evitar que un individuo que no es inmune adquiera la enfermedad?

II EPIDEMIOLOGÍA

En esta sección examinaremos los datos de control de enferemedades infecciosas basados en los principios de la epidemiologia ya descritas. Estos datos son relativos a enfermedades emergentes tal como el SIDA y las enfermedades nosocomiales y son ejemplos para que los trabajadores santarios prevean la prevención y el tratamiento.

25.6 La epidemia de SIDA

Los primeros casos del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la enfermedad infecciosa producida por un virus que daña severamente el sistema inmunitario del cuerpo (*véase* Sección 26.14), se identificaron en los Estados Unidos en 1981. Desde entonces, el número de nuevos casos de SIDA en los Estados Unidos se ha elevado en el año 2000, hubo 765 559 casos con un total de 442 882 de muertes (Figura 25.7). Anualmente se diagnostican 40 000 nuevos casos al año de SIDA en Estados Unidos. Desde 1981 al 2000, 56 millones de personas han sido infectadas en el mundo con el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH), el virus que causa el SIDA. 20 millones de personas han muerto de SIDA en el mundo y 36 millones viven actualmente con el SIDA. América del Norte tiene casi 1 millón de personas infectadas. África subsahariana tiene 25,3 millones de personas infectadas (Figura 25.8). En Botswana, el 36% de la población adulta está infectada con HIV. El SIDA causa unas 3 millones de muertes anuales (Tabla 25.1), la gran mayoría en países en desarrollo.

Como localizar una epidemia

Los estudios iniciales en Estados Unidos para controlar los primeros casos sugirieron una desacostrumbrada prevalencia elevada del SIDA en hombres homosexuales y en usuarios de drogas administradas por via intravenosa. Esto,

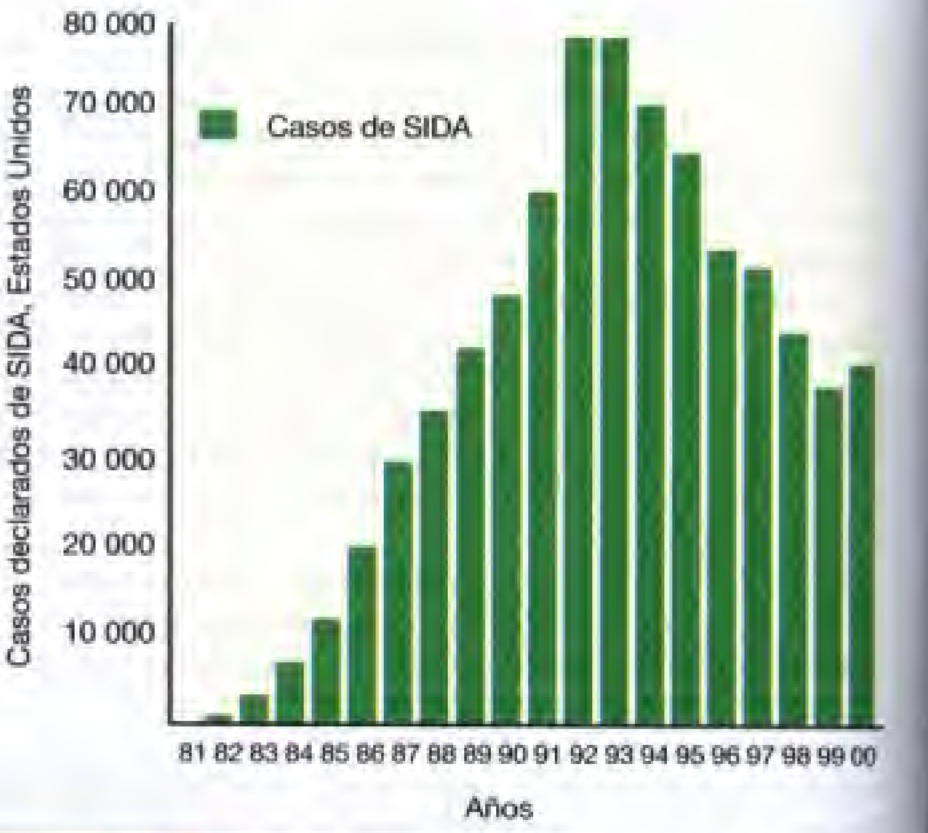


Figura 25.7 Número total de casos del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), en los Estados Unidos, desde 1981. También se muestra el número de muertes conocidas. En conjunto, hubo unos 765 559 casos de SIDA y unas 442 882 muertes debidas al SIDA, hasta el 2000. Los datos pertenecen a centro para el control de enferemedades infecciosas y prevención, division de prevención de VIH/SIDA.

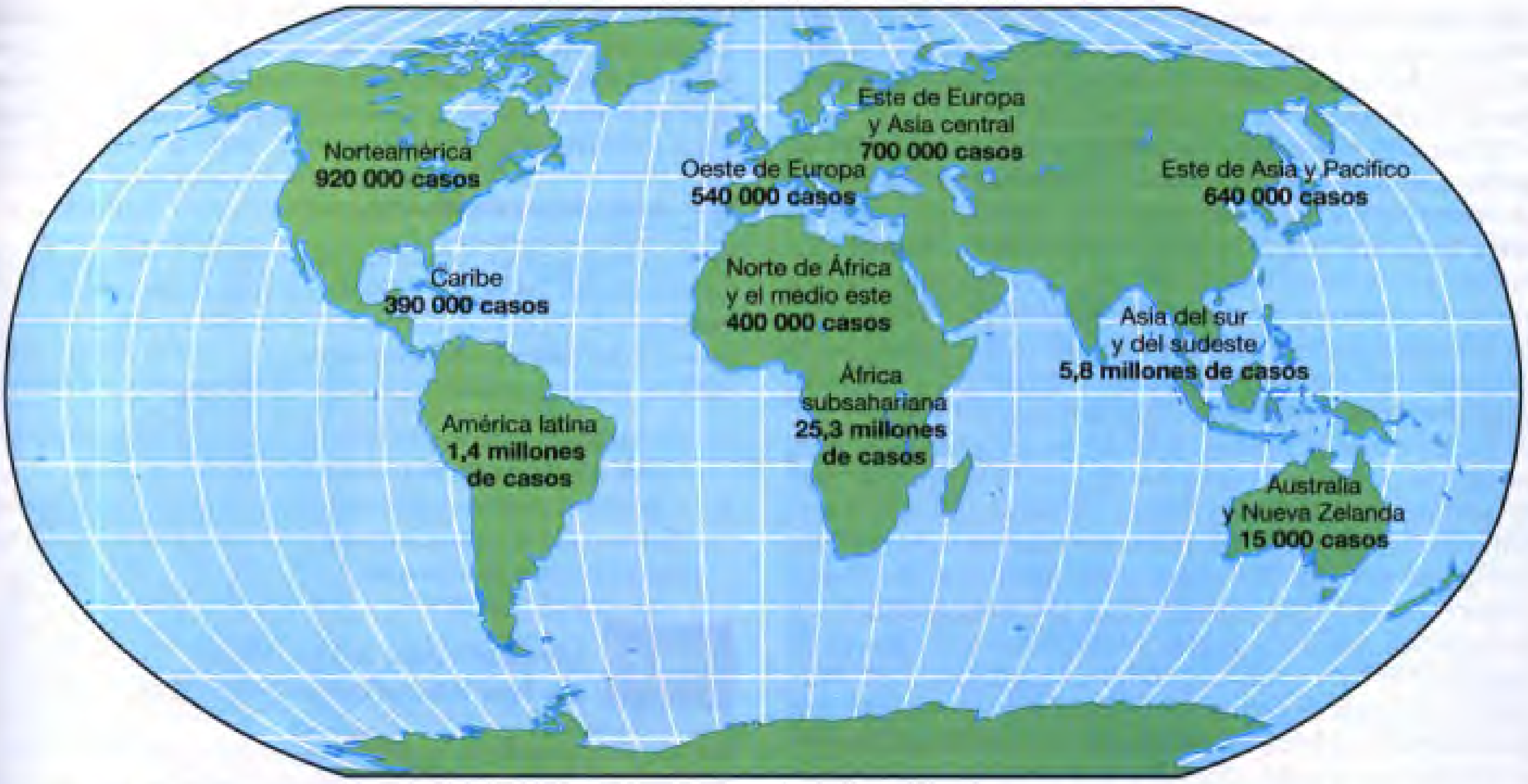

Norteamérica
920 000 casos
Caribe
390 000 casos
América latina
1,4 millones
de casos
Oeste de Europa
540 000 casos
Este de Europa
y Asia central
700 000 casos
Norte de África
y el medio este
400 000 casos
África
subsahariana
25,3 millones
de casos
Este de Asia y Pacífico
640 000 casos
Asia del sur
y del sudeste
5,8 millones de casos
Australia
y Nueva Zelanda
15 000 casos

Figura 25.8 Número de casos de SIDA en todo el mundo en el 2000. El número total se estima en 36,1 millones. Los datos pertenecen al Programa de Naciones Unidas para la prevención del SIDA.

a su vez, indicaba la existencia de un agente transmisible, que presumiblemente se transfería durante la actividad sexual o por las agujas contaminadas. Se descubrió que los individuos que requerían sangre o productos derivados de la sangre también eran de alto riesgo: hemofílicos que requieren derivados sanguíneos y un pequeño número de individuos que requerían transfusiones y trasplantes antes de 1982 adquirieron el SIDA (menos del 1% de los casos actuales de SIDA se deben a esa causa) (Figura 25.9). La conexión entre transmisión por sangre o tejido reforzó la convicción de que era un agente transmisible.

Poco después del descubrimiento del VIH, se desarrollaron pruebas de laboratorio para detectar en el suero anticuerpos frente al virus (*véanse* Secciones 24.11 y 24.12). Esto permitió una mayor vigilancia de la incidencia de la infección en distintas poblaciones y sirvió de método de escrutinio para asegurar que no se iban a transmitir más casos de SIDA mediante las transfusiones de sangre. Estas pruebas pusieron de manifiesto la existencia de un cuarto grupo de individuos de alto riesgo ante el SIDA: los niños de madres que ellas mismas eran de alto riesgo para el SIDA. Desde el comienzo del SIDA, en Estados Unidos han suce-

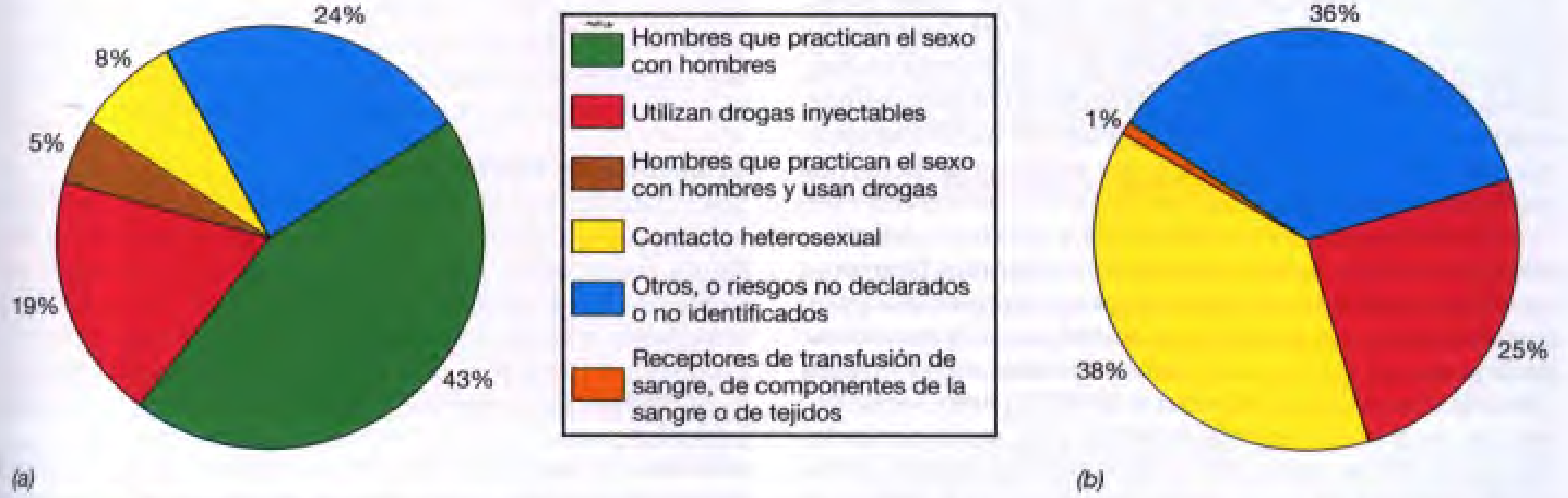


Figura 25.9 Distribución de los casos de SIDA por grupos en adolescentes y adultos, en los Estados Unidos, en el 2000. El número total de casos registrados fué 41 960. (a) SIDA en hombres. N = 31 501. (b) SIDA en mujeres. N = 10 459. Los datos pertenecen a centro para el control de enfermedades infecciosas y prevención, division de prevención de VIH/SIDA.

dido más de 8 000 casos de SIDA pediátrico. En más del 90% de casos el comportamiento de las madres (Figura 25.9*b*) fue el único factor, confirmando también la idea de que el SIDA es una enfermedad infecciosa.

El modelo presentado en la Figura 25.9*a* es típico de un agente transmisible por actividad sexual entre homosexuales. La identificación de ciertos grupos de alto riesgo bien definidos implicaba que el SIDA *no* se transmitía de persona a persona por contacto casual, tal como la vía respiratoria, ni a través de alimentos o agua contaminados. Por el contrario, los hallazgos epidemiológicos apuntaban claramente hacia los fluídos del cuerpo, principalmente la sangre y el semen, como principales vehículos de transmisión del VIH.

En los Estados Unidos, el SIDA ha afectado principalmente a hombres homosexuales (Figura 25.9*a*), pero el caso de las mujeres y de ciertas minorías étnicas apuntan que la homosexualidad no es determinante para contraer el SIDA. Este grupo es ya de alto riesgo entre las mujeres heterosexuales (Figura 25.9*b*), mientras que los afro-americanos y los hispanos que usan drogas intravenosas son capaces de transmitir el VIH como los hombres homosexuales. Además, la categoría en la que aumentan a mayor velocidad los casos de SIDA es la de los heterosexuales adultos. Este grupo de alto factor para adquirir SIDA tiene patrones comunes de comportamiento. En primer lugar, la actividad sexual y los usuarios de drogas intravenosas conllevan un cambio de *fluidos corporales*, generalmente semen y sangre. En segundo lugar, cuando se hacen *prácticas sexuales* con varias parejas, o se comparte agujas (o las dos a la vez), existe una mayor probabilidad de entrar en contacto con un individuo infectado con el VIH y por lo tanto se adquiere SIDA.

La incidencia del SIDA en personas hemofílicas receptoras de transfusiones se ha reducido enormemente durante los últimos años (Figura 25.9). Esto se debe no sólo a la vigilancia de los abastecimientos de sangre, sino también a que muchos de los factores de coagulación de la sangre que necesitan los hemofílicos pueden resistir un tratamiento térmico que es suficiente para inactivar el VIH. Los casos de SIDA pediátricos siguen siendo una gran preocupación. En el año 2000, hubo 87 nuevos casos en este grupo. El VIH puede ser transmitido al feto por las madres infectadas y probablemente tambien por la leche materna. Todos los niños nacidos de madres infectadas con el VIH tienen en su sangre anticuerpos contra el VIH obtenidos de la madre, pero para tener un diagnóstico claro del SIDA en los niños, es preciso esperar un año o más después del nacimiento porque cerca del 70% de los niños que muestran anticuerpos maternos al nacer, no desarrollan luego la infección con VIH.

Estudios epidemiológicos del SIDA en África, donde se cree que se originó la enfermedad, han mostrado claramente que la transmisión del SIDA no va ligada a determinadas prácticas sexuales, como la homosexualidad, sino a la transferencia de persona a persona de fluídos infectados con el VIH. En África, la transmisión heterosexual del SIDA parece ser la norma, con un número igual de hombres y de mujeres infectados. La identificación de grupos de alto riesgo a través de los estudios epidemiológicos condujo al desarrollo de campañas de educación sanitaria para informar al público acerca de cómo se transmite el SIDA y qué actividades constituyen una conducta de alto riesgo (*véase* recuadro «Actividad sexual y SIDA», Capítulo 26). Dado que todavía no se dispone de un medio de curación para el SIDA, la educación en sanidad pública constituye la manera más efectiva de prevenir la expansión de la infección. En la Sección 26.14 se estudia la patología y terapia del SIDA.

✓ 25.6 Revisión de conceptos

El SIDA es una de las pandemias más recientes y más estudiadas. La información disponible actualmente sugiere que el SIDA continuará siendo un importante problema de salud pública, especialmente en los países en desarrollo. No existe cura ni vacuna contra el SIDA, aunque ya se sabe mucho acerca de su patología y difusión.

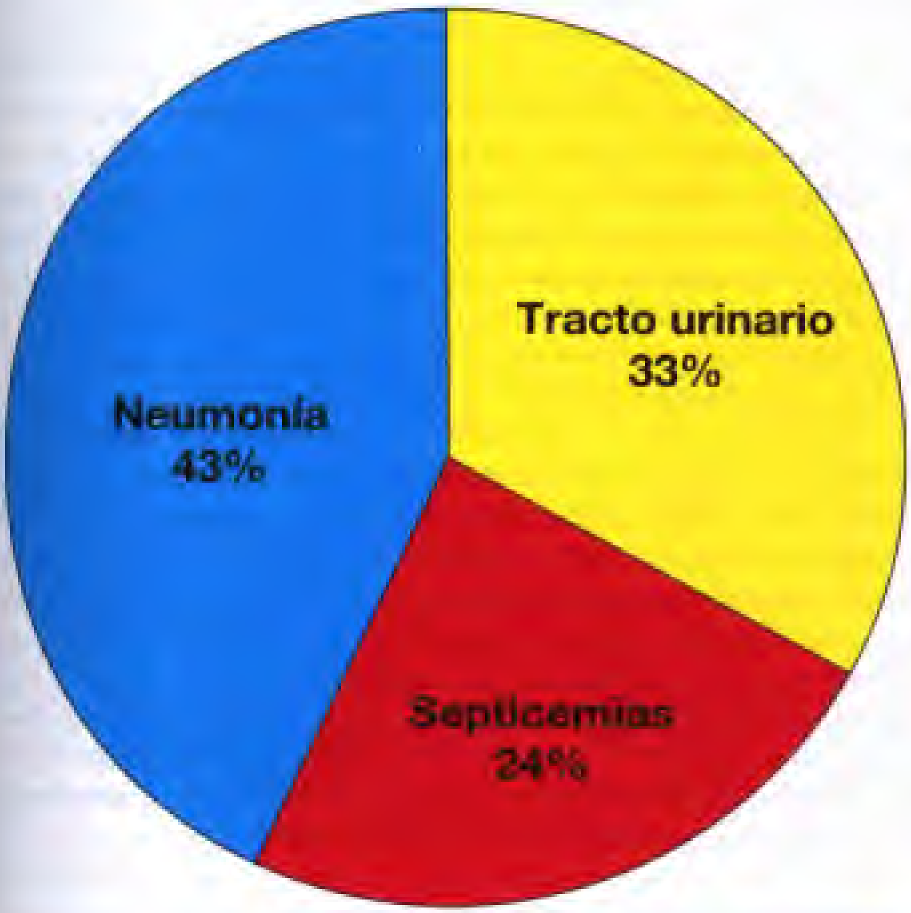
- ✓ Describa los principales factores de riesgo para adquirir el SIDA. Dé claves de su país de origen.
- ✓ Calcule el número total de individuos que ahora tienen SIDA en los Estados Unidos y haga una predicción del número de casos en el año 2005.

25.7 Infecciones adquiridas en los hospitales (nosocomiales)

Un hospital puede no ser sólo un lugar en donde se cura a las personas enfermas, sino un lugar donde las personas enfermas se ponen aún más enfermas. Las infecciones cruzadas de paciente a paciente o entre el personal del hospital y los pacientes constituyen un peligro constante. Las infecciones hospitalarias suelen denominarse *infecciones nosocomiales* (*nosocomium* es el término latino para «hospital») y tienen lugar en aproximadamente el 5% de los enfermos admitidos. En ciertos servicios clínicos, como en las unidades de cuidados intensivos, más del 10% de los pacientes adquieren una infección nosocomial. En conjunto, en los Estados Unidos, hay cada año unos 2 millones de infecciones nosocomiales que producen directa o indirectamente 80 000 muertes. Las infecciones hospitalarias se deben en parte a la prevalencia de pacientes enfermos, pero con frecuencia se deben a la presencia de microorganismos patógenos que se han seleccionado y se mantienen en el ambiente del hospital. Estas infecciones las producen organismos que ya están en el ambiente del hospital. Incluso organismos con resistencia múltiple a las drogas, con frecuencia pasan de hospedador a hospedador como flora normal. Por tanto, prácticamente todos los patógenos nosocomiales importantes son flora normal, tanto en pacientes como en el personal sanitario.

El ambiente hospitalario

Los hospitales son ambientes especiales. Las enfermedades infecciosas se extienden fácilmente y rápidamente en el ambiente hospitalario, por varias razones. (1) En muchos pacientes se ha debilitado la resistencia a las enfermedades infecciosas, a causa de su enfermedad (hospedadores comprometidos) (*véase* Sección 21.13). (2) En los hospitales se trata a pacientes que padecen enfermedades infecciosas y estos pacientes pueden ser reservorios de patógenos altamente virulentos. (3) La aglomeración de pacientes en las habitaciones y en los consultorios aumenta la probabilidad de infecciones cruzadas. (4). El personal del hospital se mueve de un paciente a otro, aumentando la probabilidad de transferencia de patógenos. (5) Muchos procedimientos hospitalarios tales como la cateterización, la inyección hipodérmica, la punción lumbar y la recogida de muestras de tejidos (biopsias) o fluídos, llevan inherente el riesgo de introducir patógenos en el hospedador. (6) En las salas de maternidad de los hospitales, los niños recien nacidos son especialmente susceptibles a ciertas clases de infeccion porque carecen de un sistema inmunitario bien desarrollado. (7) Los procedimientos quirúrgicos constituyen un importante riesgo porque no sólo exponen órganos internos a las fuentes de contaminación, sino que además el estrés de la cirujía disminuye la resistencia del paciente a la infección. (8) Muchas de las drogas utilizadas para la inmunodepresión (por ejemplo en los procedimientos de transplante de órganos) aumentan la susceptibilidad a la infección. (9) El uso de antibióticos para controlar la infección conlleva el riesgo de seleccionar organismos resistentes a los antibióticos (Sección 20.12). La Figura 25.10 resume la información relativa a las infecciones más prevalentes adquiridas en los hospitales.



	Septicemias	Neumonía	Tracto urinario
Patógeno	**Nº**	**Nº**	**Nº**
Enterobacter spp.	1083	4444	1560
Escherichia coli	514	1725	5393
Klebsiella pneumoniae	735	2865	1891
Haemophilus influenzae		1738	—
Pseudomonas aeruginosa	841	6752	3365
Staphylococcus aureus	2758	7205	497
Staphylococcus spp.	8181		838
Enterococcus spp.	2967	682	4226
Candida albicans	1090	1862	4856
Todos los demás patógenos	3774	12 537	8075
Número total	21 943	39 810	30 701

Figura 25.10 Distribución de las infecciones nosocomiales en las UCI de Estados Unidos por sitio y organismo, 1992-1999. El número total de infecciones nosocomiales fue de 92 454. Los datos pertenecen al centro para el control de enferemedades infecciosas y prevención, Atlanta, Georgia, USA, division de infecciones nososcomiales.

Patógenos hospitalarios

Los patógenos hospitalarios infectan preferentemente varios sitios, por ejemplo, el tracto urinario, la sangre y el tracto respiratorio. Un número relativamente limitado de organismos causan la mayoría de las infecciones hospitalarias (Figura 25.10).

Uno de los patógenos hospitalarios más importantes y extendidos es *Staphylococcus aureus*. En la mayoría de los casos está asociado a pneumonía e infecciones de la sangre (septicemia, la tercera causa de septicemias) y constituye un problema especial en las infecciones de los recién nacidos en el hospital. Ciertas cepas con una virulencia desacostumbrada se han asociado ampliamente a las infecciones hospitalarias y son resistentes a los antibióticos (Sección 20.12), haciendo su tratamiento muy difícil. Actualmente *S. aureus* y un grupo de otras cepas de *Staphylococcus* spp. constituyen colectivamente la causa más común de las septicemias (una aguda respuesta del hospedador debida a la presencia de organismos en la sangre) adquiridas en los hospitales y son también importantes agentes de las infecciones de las heridas. El hábitat de estos estafilococos son las vías respiratorias altas, generalmente los conductos nasales, y con frecuencia se establecen como microbiota del personal hospitalario.

Escherichia coli, probablemente introducido a partir de la biota normal, es la causa más común de infecciones de las vías urinarias en los hospitales, asimismo son frecuentes la infecciones producidas por otras bacterias como *Enterococcus* y *Pseudomonas aeruginosa*, la levadura *Candida albicans* y *Klebsiela pneumoniae*. Mientras que *Enterococcus*, *E. coli* y *K. pneumoniae* son encontradas en el cuerpo humano, *Candida* y *Pseudomonas* son ejemplos de *patógenos oportunistas*: son comunes sus infecciones en los individuos que tienen debilitado en sistema inmune (Sección 21.13). *P. aeruginosa* las cepas aisladas en hospitales son normalmente resistentes frente a muchos antibióticos, complicando así el tratamiento. *E. coli*, *Staphylococcus* y *Enterococcus* tienen un potencial de resistencia frente a muchos antibióticos (Sección 20.12).

✓ 25.7 Revisión de conceptos

Ciertos organismos que de ordinario no son patógenos importantes en poblaciones normales, causan graves enfermedades en los hospitales. Los pacientes son susceptibles a infecciones y están expuestos a una variedad de patógenos potenciales, incluidos los patógenos oportunistas, en el ambiente hospitalario. Los tratamientos son normalmente difíciles por las resistencias a los antibióticos.

- ✓ ¿Por qué los pacientes que están en los hospitales son más susceptibles a los patógenos que los individuos normales?
- ✓ ¿Por qué los resistentes a los antibióticos son un importante problema en las instalaciones hospitalarias?
- ✓ ¿Cuál es la principal fuente de patógenos oportunistas?

III EPIDEMIOLOGÍA Y SALUD PÚBLICA

En esta sección indentificaremos los métodos de moda para contener y erradicar las enfermedades infecciosas en la población. También indentificaremos los más importantes futuros medios para controlar las enfermedades infecciosas y la salud pública.

25.8 Medidas de salud pública para el control de enfermedades

La epidemiología de una enfermedad infecciosa permite desarrollar métodos para controlar la enfermedad. La **sanidad pública** se refiere a la salud de la población como un todo y a las actividades de las autoridades sanitarias en el control de las enfermedades. Sin embargo la incidencia de muchas enfermedades infecciosas ha decaído espectacularmente, especialmente en los países desarrollados, durante los últimos cien años, no debido a los esfuerzos de la sanidad pública, sino debido a un aumento general del bienestar de la población. Una mejor nutrición, menor aglomeración en las viviendas y menores cargas en el trabajo, sin duda han contribuido tanto como las medidas sanitarias, al control de enfermedades como la tuberculosis, principalmente reduciendo los factores de riesgo relacionados con la enfermedad (Sección 21.13). Sin embargo, enfermedades como la fiebre tifoidea, la difteria, la brucelosis y la poliomielitis deben su baja incidencia a medidas de sanidad pública activas y específicas.

Controles dirigidos a los reservorios

Si la enfermedad ocurre principalmente en *animales domésticos*, la enfermedad en las personas puede evitarse si se elimina de la población animal infectada. Para eliminar la enfermedad en los animales y consecuentemente para las personas, pueden utilizarse procedimientos de inmunización o de destrucción de los animales infectados. Estos procedimientos han resultado muy eficaces para eliminar de las personas la brucelosis y la tuberculosis bovina. Recientemente estos procedimientos han sido utilizados para eliminar la encefalitis espongiforme bovina (enfermedad de las vacas locas) en las vacas del Reino Unido. De esta manera también se mejora la salud de la población de animales domésticos, con los posibles beneficios económicos para los ganaderos.

Cuando el reservorio es un *animal salvaje*, entonces la erradicación es mucho más difícil. *La rabia* es una enfermedad que ocurre tanto en animales salvajes como domésticos, pero que se transmite a los animales domésticos principalmente por los animales salvajes. Por ello, el *control* de la rabia puede lograrse inmunizando a los animales domésticos, aunque esto nunca conduce a la *erradicación* completa de la enfermedad. La mayoría de los casos de rabia se produce en animales salvajes, no en los domésticos, al menos en los Estados Unidos (*véase* Sección 27.1). Por tanto, la *erradicación* de la rabia requeriría la inmunización o la destrucción de todos los animales salvajes que actuan de reservorio, los cuales incluyen a diversas especies como los mapaches, los murciélagos, las mofetas y los zorros. Aunque la inmunizacion oral contra la rabia es práctica y se recomineda para el control de la rabia en poblaciones limitadas de animales, no se ha comprobado su eficacia en grandes poblaciones de diversos animales en los Estados Unidos.

Si el reservorio es un *insecto*, (como el mosquito en el caso de la malaria), puede lograse el control eficaz de la enfermedad eliminando el reservorio con insecticidas químicos u otros agentes letales. Sin embargo, su uso debe estar equilibrado con las exigencias ambientales acerca de la utilización de productos químicos tóxicos o carcinógenos, ya que a veces la eliminación de un problema de sanidad pública puede crear otro más grave. Por ejemplo, el insecticida dicloro difenil tricloroetano (DDT) (*véase* Sección 19.18) es muy efectivo contra los mosquitos y ha logrado eliminar la fiebre amarilla y el paludismo de Norteamérica. Sin embargo, actualmente su uso está prohibido en los Estados Unidos, por cuestiones ambientales. El DDT se utiliza todavía ampliamente en muchos países en desarrollo, para controlar las enfermedades transmitidas por los mosquitos, pero está declinando fuertemente su uso.

Cuando el reservorio son las *personas* (por ejemplo en el SIDA), entonces el control y la erradicación es mucho más difícil, especialmente si se trata de portadores asintomáticos. Por otro lado, las enfermedades limitadas a humanos que no tienen fase asintomática y se pueden prevenir gracias a la inmunización o tratadas con quimioterapia, pueden ser erradicadas los contactos posibles aislados con una cuarentena estricta, que son inmunizados y tratados. Esta estrategia ha sido empleada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para erradicar la viruela y en el presenta se piensa erradicar la polio (*véase* abajo).

Control dirigido contra la transmisión del patógeno

Si el organismo es transmitido por los alimentos o el agua, los procedimientos de sanidad pública pueden aplicarse, bien para evitar la contaminación de esos vehículos o bien para destruir el patógeno que está en el vehículo. Los métodos de potabilización del agua (*véase* Sección 28.3) han sido responsables de la espectacular reducción de la incidencia de la fiebre tifoidea y la pasteurización de la leche ha ayudado a controlar la tuberculosis bovina en las personas. Se han diseñado leyes de protección de los alimentos que han hecho disminuir notablemente la posibilidad de transmisión de un cierto número de patógenos entéricos a las personas (*véase* Capítulo 29). La transmisión de los patógenos respiratorios es mucho más difícil de evitar. Los intentos para desinfectar el aire con productos químicos no han tenido éxito. La filtración de aire es un método viable, pero se limita a áreas pequeñas (*véase* Sección 20.3). En Japón, muchos individuos llevan mascarillas cuando tienen infecciones de las vías respiratorias altas, para evitar la transmisión a otras personas, pero tales métodos, aunque efectivos, son voluntarios y sería difícil instaurarlos como medidas obligatorias de sanidad pública.

Vacunación

La viruela, difteria, tétano, tos ferina, sarampión, paperas, rubeola y polio han sido controladas primariamente por inmunización. Como se vio en la Sección 25.5, para controlar una enfermedad en una población no es necesario el 100% de inmunización, aunque el porcentaje necesario para controlar la enfermedad varía de acuerdo con la virulencia del patógeno y con las condiciones de la población (por ejemplo el hacinamiento).

El sarampión ha sido un ejemplo de la importancia de mantener la inmunización para determinado patógeno. Hasta 1963, en que una vacunación efectiva frente al sarampión se aprobó, en Estados Unidos cada niño se inmunizó frente al sarampión por infección natural, resultando más de 400 000 casos anuales. Después de la introducción de la vacuna la enfermedad cayó estrepitosamente. El número de casos en 1983 fue de 1497 (*véase* Sección 26.7). Sin embargo, en 1990 el porcentaje de niños inmunizados frente al sarampión disminuyó al 70% y el número alcanzó los 27 786. Con tres años de esfuerzo, la inmunización alcanzó al 90% y la transmision se eliminó en Estados Unidos. En 1993 se alcanzó la cifra de 312 casos. Alrededor de 100 casos de sarampión son declarados en Estados Unidos en los últimos años, alrededor de la mitad posiblemente importados por visitantes de otros países.

Muchos adultos están inadecuadamente inmunizados frente a varios agentes infecciosos, bien porque han recibido vacunas de título bajo cuando eran niños o bien porque su inmunidad ha ido desapareciendo gradualmente con la edad. En los Estados Unidos, más del 80% de los adultos puede carecer de una sólida inmunidad frente a importantes enfermedades de la infancia. Cuando las llamadas enfermedades de la infancia aparecen en adultos pueden tener graves efectos. Si una mujer contrae la rubeola (una enfermedad vírica) (*véase* Sección 26.7) durante el embarazo, el feto puede sufrir graves alteraciones y desórdenes neurológicos. El sarampión y la polio también son mucho más serios en los adultos que en los niños

Se aconseja que todos los adultos revisen su estado de inmunización, comprobando sus fichas médicas (si están disponibles) para asegurarse de las fechas de vacunación. La vacunación contra el tétanos debe renovarse cada 10 años. Revisiones sobre poblaciones de adultos han mostrado que más del 10% de los adultos de menos de 40 años y más del 50% de los que tienen más de 60 años no están protegidos. La inmunidad frente al sarampión en los adultos también es preciso revisarla. Las personas que nacieron antes de 1957, problamente contrajeron el sarampión de pequeños y están inmunizados. Aquellas nacidas después de 1956 pueden haber sido vacunadas, pero la efectividad de las primeras vacunas era variable y puede no haber ahora una inmunidad sólida, especialmente si la vacunación se recibió antes de tener un año de edad. La revacunación contra la polio no se recomienda a los adultos, a menos de que vayan a viajar por África y Asia donde la polio todavía es prevalente.

Las prácticas y procedimientos de vacunación se han estudiado en la Sección 22.11 y aquellas para infecciones determinadas se verán en los Capítulos del 26 al 29.

Cuarentena

La **cuarentena** implica restringir el movimiento de los individuos con infecciones activas, para evitar la dispersión de la enfermedad entre otros miembros de la población. El *tiempo límite* de la cuarentena es el periodo más largo de transmisibilidad de una enfermedad determinada. La cuarentena debe hacerse de tal manera que el individuo infectado no pueda estar en contacto con individuos que no han sido expuestos. La cuarentena no es una medida tan severa como el aislamiento estricto, el cual se utiliza para enfermedades desacostumbradamente infecciosas en situaciones hospitalarias.

Mediante un acuerdo internacional, se consideran susceptibles de guardar cuarentena seis enfermedades: la viruela, el cólera, la peste, la fiebre amarilla, la fiebre tifoidea y la fiebre recurrente. Aunque la viruela ha sido eliminada del mundo, sigue en vigor la necesidad de cuarentena para las otras cinco enfermedades. Cada una de ellas se considera una enfermedad especialmente transmisible y sumamente grave. La diseminación de otras enfermedades muy contagiosas, como la fiebre hemorrágica por el virus Ébola y la meningitis pueden ser controladas por cuarentena (*véanse* Tabla 25.5 y Sección 25.10).

Vigilancia

La **vigilancia** es la observación, reconocimiento y declaración de las enfermedades, cuando aparecen. La lista de enfermedades bajo vigilancia en los Estados Unidos aparece en la Tabla 25.3. Observe que varias de las enfermedades epidémicas en la lista de la Tabla 25.2 no estan bajo vigilancia. Sin embargo, algunas enfermedades como la gripe estan vigiladas a través de laboratorios regionales que identifican *casos index*, casos que presentan síndromes, características o patógenos nuevos, que indican un alto potencial para originar nuevas epidemias.

Erradicación del patógeno

La **erradicación** de una enfermedad se consigue en algunas ocasiones, como ocurrió con la viruela. La viruela sólo afectaba a humanos que sufrían episodios agudos de viruela y su transmisión era de persona a persona. Los individuos infectados transmitían la enfermedad a los individuos vulnerables a la enfermedad, por contacto directo. La viruela es una enfermedad vírica y no se puede tratar, pero la vacuna fue muy efectiva: la vacunación con una cepa parecida del virus producía una inmunidad efectiva frente a la viruela. En 1967 la OMS (Organización Mundial de la Salud) ideó un plan para eradicar la viruela. Dado que la vacunación se llevó a cabo con éxito en países desarrollados, la viruela quedó restringida a África, Oriente Medio e India. Después de un programa preliminar de vacunar las áreas endémicas, los brotes de viruela fueron controlados por personal de la OMS que viajaban y sometían a cuarentena a los individuos con viruela y vacunaban a los contactos directos a los contactos de los contactos. Esta agresiva política erradicó la viruela en una década y la OMS declaró erradicada la viruela en 1980.

La polio, con un programa efectivo de inmnunización, ya está erradicada del hemisferio Oeste. Utilizando la misma estrategia que se usó para la viruela en 1996 se inmunizaron 420 millones de personas frente a la polio, lo hizo la OMS. En el 2001 los brotes de polio se limitaban a Mauritania, Egipto, Nigeria y Somalia en África, como en India, Pakistán y Afganistán.

Tabla 25.3 Enfermedades de declaración obligatoria en los Estados Unidos

Enfermedades causadas por bacterias
Carbunco
Botulismo
Brucelosis
Chancro
Chlamydia trachomatis, infecciones en genitales
Cólera
Difteria
Erlichiosis
Enterohemorragias *Escherichia coli*
Escherichia coli O157:H7
Gonorrea
Haemophilus influenzae, enfermedad invasiva
Enferemedad de Hansen (lepra)
Síndrome de uremia hemolítica, post-diarrea
Legionelosis
Listeriosis
Enfermedad de Lyme
Infecciones meningocócicas
Tos ferina
Peste
Psitacosis
Fiebre Q
Fiebre menchada de las Montañas Rocosas.
Salmonelosis
Shigelosis
Enfermedad por estreptococos, invasiva, tipo A
Shock del síndrome tóxico de estreptococos
Streptococcus pneumoniae, invasivo y resistente a drogas
Sífilis, aguda y congénita
Tétanos
Shock del síndrome tóxico

Enfermedades causadas por bacterias
Tuberculosis
Tularemia
Fiebre tifoidea

Enfermedades causadas por hongos (hongos, levaduras)
Cocidiomicosis
Criptoporidiosis

Enfermedades causadas por virus
Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), y SIDA pediátrico
Encefalitis
  Serogrupo de California
  Equina del este
  San Luis
  Equina del oeste
Síndrome pulmonar de hantavirus
Hepatitis A, B, C/ no A, no B
Infección por VIH
  Adulta
  Pediátrica (menos de 13)
Sarampión
Paperas
Poliomielitis paralítica
Rabia animal y humana
Rubeola síndrome agudo y congénito
Varicela (muertes solo)
Fiebre amarilla

Enfermedades causadas por protozoos
Ciclosporiasis
Paludismo

Enfermedades causadas por helmintos
Triquinosis

La lepra solo tiene reservorio en humanos y se prevé la erradicación en breve. Los casos de lepra activos se tratan con múltiples drogas y se previene la expansión de la lepra, el agente causal de la lepra es *Mycobacterium leprae* (*véase* Sección 26.5).

Otras enfermedades para las que se prevee la erradicación son la enfermedad de Chagas (tratamiento activo de los casos y destrucción del insecto de su gusano parásito) y la dracunculiasis (potabilización del agua de bebida para impedir la difusión del parásito gusano de Guinea). Otros candidatos para la erradicación son la sífilis (*véase* Sección 26.12) y la rabia (*véase* Sección 27.1).

✓ 25.8 Revisión de conceptos

Las normativas sobre la calidad y pureza del agua y de los alimentos, el control de los vectores, las cuarentenas y la vigilancia de las enfermedades son medidas de sanidad pública que desempeñan una importante función en la reducción de la incidencia de las enfermedades.

- ✓ Compare las medidas públicas para controlar las enfermedades infecciosas causadas por insectos reservorios y por portadores humanos.
- ✓ ¿Qué métodos de sanidad pública pueden utilizarse para detener la dispersión de una enfermedad, una vez que se ha iniciado?

25.9 Consideraciones sobre la salud global

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha dividido el mundo en 6 regiones geográficas con el fin de recoger información sobre la salud, indicando la morbilidad y mortalidad. Estas regiones son África, América (América del Norte, el Caribe, América Central y América del Sur), el Mediterráneo del Este, Europa, el sudeste asiático y el Pacífico oeste. Aquí compararemos los datos de la mortalidad de una zona desarrollada (América) frente a otra en vías de desarrollo (África).

Enfermedades infecciosas en América y África: comparación

Aproximadamente viven 800 millones de personas en América. Cada año hay 5,7 millones de muertes, 7 muertes por cada 1000 habitantes/año. En África hay 600 millones de personas, 10,4 millones de muertes por año, 17 muertes por 1000 habitantes/año. Esta estadística por sí sola causa preocupación, la información sobre las muertes es más informativa. La Figura 25.11 indica que las muertes en África se producen por enfermedades infecciosas, mientras que en América el cáncer y las enfermedades cardiovasculares son

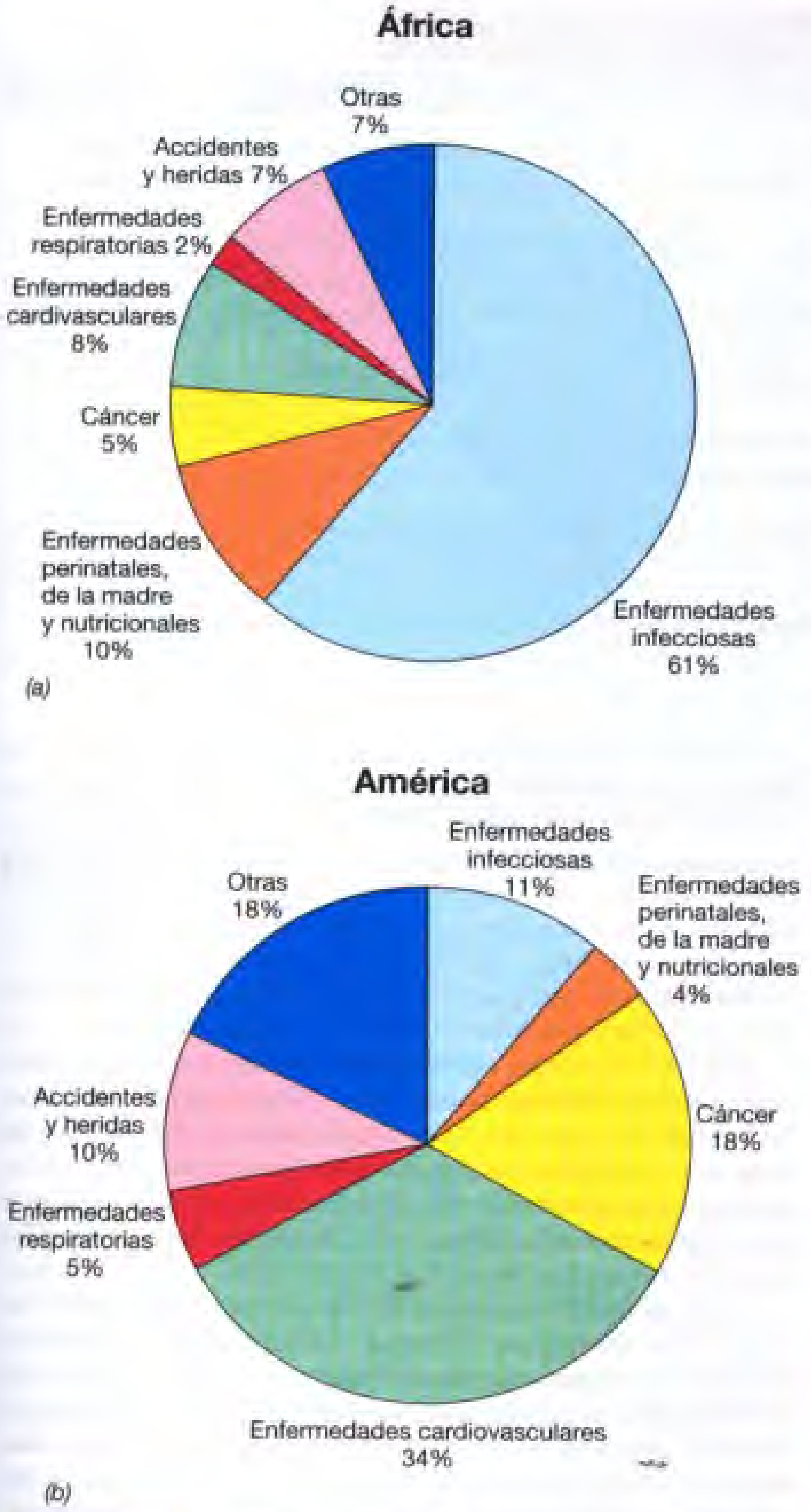


Figura 25.11 Causas principales de muerte en América y África, 1999. (a) África. (b). América. Los sectores circulares muestran el % de mortalidad para 1999. De los aproximadamente 10,4 millones de muertes al año en África, 6,3 millones de muertes son debidas a enfermedades infecciosas. Ha habido 5,7 millones de muertes en América, 627 000 debidas a enfermedades infecciosas.

las causas más importantes de mortalidad. En África las muertes por enfermedades infecciosas tienen 10 veces más probabilidad de ocurrir. Basado en la experiencia de los países en desarrollo (*véase* Figura 1.7) esta diferencia en la incidencia de muertes de la infecciones son debidas a la salud pública. La falta de recursos para el desarrollo limita el acceso al cuidado sanitario, alimentos y agua saludable y un programa efectivo de vacunación.

Viajar a zonas endémicas

La alta incidencia de enfermedades en muchas partes del mundo es también una preocupación para las personas que viajan a estas zonas. Es posible inmunizarse frente a muchas de las enfermedades que son endémicas en países extranjeros. Algunas de las recomendaciones típicas sobre la inmunización, para aquellos que viajen, se muestran en la Tabla 25.4. Muchos países exigen certificados de inmunización frente a la fiebre amarilla, pero la mayoría de las otras inmunizaciones sólo se recomienda a personas que se espera que se sometan a situaciones de alto riesgo. En muchas partes del mundo existe también el riesgo de exposición a otras enfermedades (por ejemplo, la fiebre hemorrágica Ébola, el dengue, la amebiasis, la encefalitis, la malaria y el tifus) para las cuales no existen vacunas adecuadas. Se recomienda a los viajeros que adopten las precauciones razonables para evitar picaduras de insectos y mordeduras de animales, que beban solamente agua que haya sido tratada adecuadamente y que coman alimentos convenientemente almacenados y preparados, y que se sometan a programas de terapia antibiótica y quimioterapia cuando exista la sospecha de una exposición a patógeno.

✓ 25.9 Revisión de conceptos

Las enfermedades infecciosas son responsables de más del 30% de todas las muertes que se producen en el mundo. La mayoría de enfermedades infecciosas ocurren en países en desarrollo. Medidas de control tales como las inmunizaciones adecuadas, especialmente cuando se viaja por paises en desarrollo y tomar medidas adecuadas para prevenir la infección.

- ✓ Establezca las diferencias entre la mortalidad debidas a las enfermedades infecciosas en África y América.
- ✓ Haga una lista de enfermedades infecciosas frente a las cuales usted no está inmunizado y de aquellas con las que puede entrar en contacto el año próximo.

25.10 Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes

Las enfermedades infecciosas son problemas globales de la salud y el ámbito y el foco de estas enfermedades cambian continuamente. En esta sección, vamos a ver algunos cambios recientes en las pautas de los brotes de las enfermedades infecciosas, y los métodos utilizados por los epidemiólogos para identificar y enfrentarse a los nuevos retos de la sanidad pública.

La distribución de las enfermedades en el mundo puede variar de forma espectacular y rápidamente. Alteraciones en el patógeno, en el ambiente, o en la población de hospedadores pueden contribuir a la rápida expansión de nuevas enfermedades con potencial para una elevada morbilidad y mortalidad entre los individuos infectados. Nos referimos a enfermedades que, de forma repentina, se hacen prevalentes como enfermedades **emergentes.** Las infecciones emergentes no están limitadas a «nuevas» enfermedades sino que incluyen también el **resurgir de enfermedades** que se creía controladas, especialmente a medida que los

Tabla 25.4 Inmunizaciones requeridas o recomendadas para viajar a países en desarrollo

Enfermedad	Destino	Recomendaciones
Cólera	Muchas naciones centroafricanas, la India, Paquistan, Corea del Sur, Albania, Malta, áreas endémicas de Sudmérica.	*Se recomienda la vacunación* cuando se viene de países endémicos o se continua en esas zonas
Fiebre amarilla	Paises tropicales y subtropicales, de todo el mundo	*Con frecuencia se requiere la vacunación* para entrar, o bien si se viene de un pais endémico
Peste	La mayoría de las tierras altas montañosas de Africa, Asia y Sudamérica	*Se recomienda la vacunación* si se va a tener contacto con roedores
Hepatitis infecciosa (A)	Areas tropicales específicas y muchos países en desarrollo	*Se recomienda la vacunación*
Hepatitis infecciosa (B)	Africa, Indochina, Europa del Sur y del Este, países de la antigua Unión Soviética, América Central y del Sur.	*Se recomienda la vacunación*
Fiebre tifoidea	Muchos países de Africa, Asia, América Central y América del Sur.	*Se recomienda la vacunación*

También se recomienda la vacunación para la difteria, tos ferina, tétanos, polio, sarampión, paperas y rubeola. La mayoría de los ciudadanos estadounidenses ya están inmunizados a través de las prácticas normales de inmunización.

antibióticos van siendo menos efectivos y los sistemas de sanidad pública fallan. Algunos de los ejemplos dramáticos más recientes de enfermedades que resurgen se muestran en la Figura 25.12, a escala global. Algunas enferemedades emergentes y reemergentes son descritas en la Tabla 25.2, son potenciales causas de epidemias generalizadas o incluso de pandemias.

El fenómeno de enfermedades que emergen repentinamente con proporcionees epidémicas, no es nuevo. Algunas de las enfermedades que emergieron en el pasado hasta hacerse prominentes fueron la sífilis (causada por *Treponema pallidum*) (*véase* Sección 26.12) y la peste (causada por *Yersinia pestis*) (*véase* Sección 27.6). En la Edad Media, más de un tercio de los seres humanos fueron víctimas de la epidemia de peste que barrió Europa, Asia y África. La gripe causó una devastadora epidemia mundial en 1918-1919 (*véanse* Figura 25.1 y Sección 26.8). En los años 1980, la legionelosis (causada por *Legionella pneumophila*) (*véase* Sección 28.7), el síndrome de la inmunodefiencia adquirida (SIDA, causada por el virus HIV) (*véase* Sección 26.14) y la enfermedad de Lyme (causada por *Borrelia burgdorferi*) (*véase* Sección 27.1) se convirtieron en importantes enfermedades epidémicas.

Factores de emergencia

Algunos factores responsables de la emergencia de nuevos patógenos son (1) la demografía y el comportamiento humano, (2) la tecnología y la industria, (3) el desarrollo económico y el uso de la tierra, (4) los vuelos y el comercio internacionales, (5) la adaptación y los cambios microbianos, (6) la rotura de medidas de sanidad pública y (7) la aparición de hechos naturales anormales que alteran el equilibrio normal hospedador-patógeno.

La *demografía* de las poblaciones humanas ha cambiado espectacularmente en los dos últimos siglos. En 1800, menos del 2% de la población mundial vivía en áreas urbanas. Por el contrario, hoy en día, casi la mitad de la población del mundo vive en las ciudades. El número, tamaño y densidad de las poblaciones de los modernos centros urbanos hace mucho más fácil la transmisión de las enfermedades. Por ejemplo, la fiebre del dengue (Tabla 25.5) se reconoce ahora como una grave enfermedad hemorrágica de las ciudades tropicales, debido en gran parte a que el virus ha sido dispersado por el mosquito *Aedes aegypti*. La enfermedad ahora se extiende como una epidemia por las zonas tropicales urbanas. Antes de 1950, la fiebre del dengue era rara, probablemente porque no era fácil difundir el virus entre una población mucho más pequeña y más dispersa.

El *comportamiento humano*, especialmente en las grandes poblaciones, también contribuye a la expansión de la enfermedad. Por ejemplo, la promiscuidad sexual y el uso de drogas inyectables, centradas principalmente en grandes áreas urbanas, han sido uno de los principales factores que han contribuído a la difusión del SIDA y de la hepatitis (Tabla 25.5; *véanse* Secciones 26.11 y 26.14).

Aunque los *avances tecnológicos* y el *desarrollo industrial* han tenido un impacto general positivo sobre el nivel de vida en todo el mundo, en algunos casos estos avances han contribuido a difundir enfermedades. Por ejemplo, uno de los principales avances tecnológicos del siglo XX ha tenido lugar en el area de la salud. Sin embargo, como hemos observado en la Sección 25.7, el ambiente para el cuidado de la salud, principalmente en los hospitales, ha dado como resultado un aumento explosivo de las infecciones nosocomiales. La resistencia a los antibióticos en los microorganismos es otro de los logros negativos de las prácticas modernas para el cuidado de la salud. Los enterococos resistentes a la vancomicina y *Streptococcus pneuminiae* resistentes a varias drogas se han convertido en importantes causas de enfermedades emergentes, especialmente en los paises desarrollados

El transporte, la producción a granel y los métodos centralizados de distribución se han convertido en un importante factor para asegurar la calidad y la economía en la industria alimentaria. Sin embargo, estos mismos factores pueden aumentar el potencial de epidemias con una fuente común, cuando fallan las medidas sanitarias. Por ejemplo, una sóla planta de distribución de carne hizo llegar

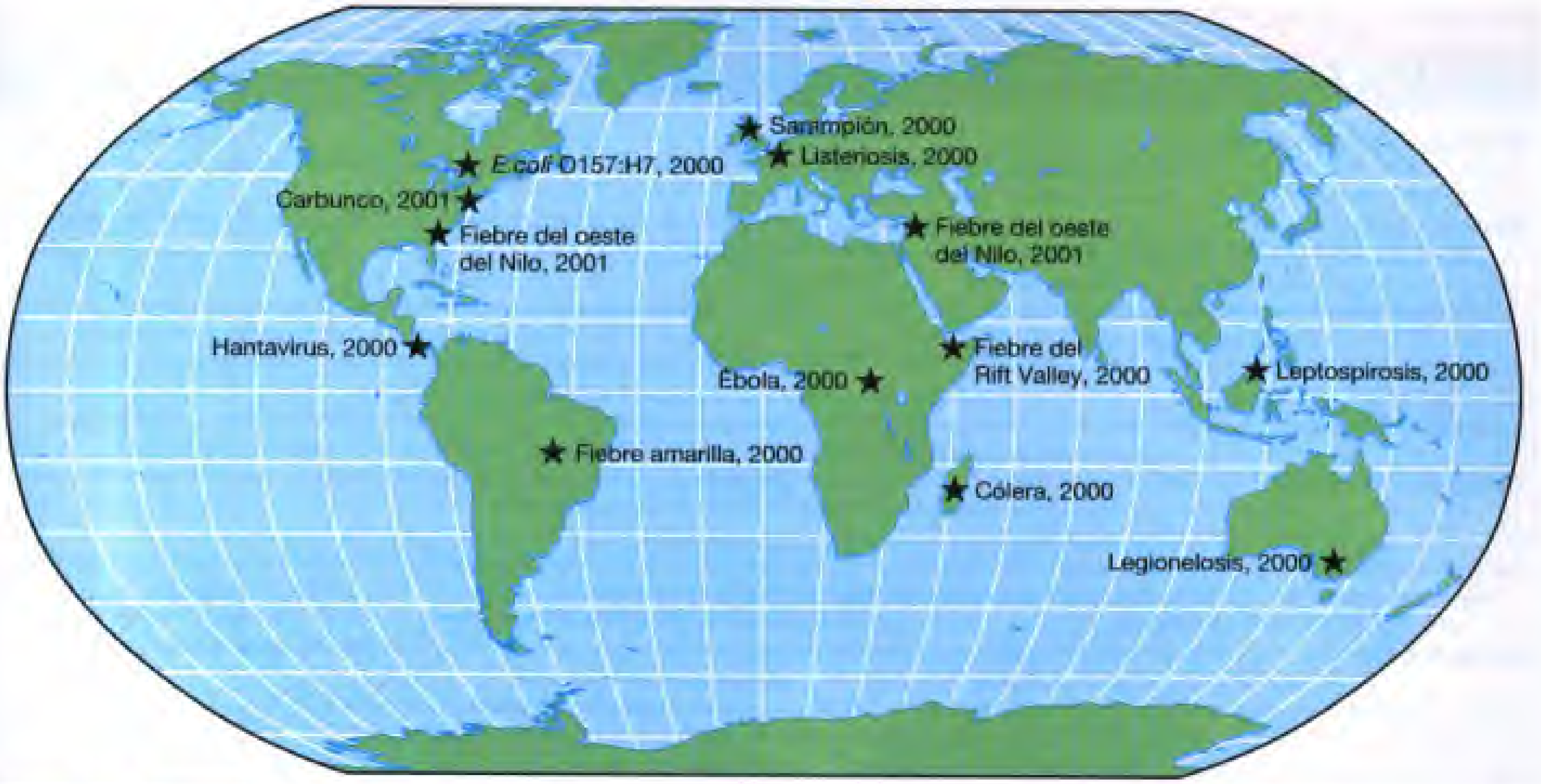


Figura 25.12 Brotes recientes de enfermedades infecciosas emergentes y resurgentes, a escala mundial.

Escherichia coli O157:H7 (Tabla 25.5) al menos a 500 individuos de cuatro estados de los Estados Unidos. Finalmente la fuente alimentaria, carne de buey picada, se identificó y se frenó la epidemia, pero no antes de que murieran varias personas (*véase* Sección 29.7).

El desarrollo económico y los cambios en el uso de la tierra tambien tienen implicaciones potenciales en la promoción de la dispersión de las enfermedades. Por ejemplo, la fiebre de Rift Valley, una infección vírica transmitida por un mosquito, ha ido aumentando desde que se construyó la presa de Assuan en Egipto, en 1970. La presa creó 2 millones de acres de tierras inundadas, lo que aumentó de manera espectacular las zonas de apareamiento del mosquito, además de un nuevo reservorio. La primera epidemia importante de fiebre del Rift Valley tuvo lugar en Egipto en 1977, cuando enfermaron unas 200 000 personas y murieron 598. Desde entonces se han producido algunos brotes, incluido el importante que tuvo lugar en 1993 (Figura 25.12) y la enfermedad se ha hecho endémica cerca del reservorio.

La enfermedad de Lyme, la enfermedad mas común de las transmitidas por un vector en los Estados Unidos, está probablemente en aumento debido a *cambios en la utilización de la tierra*. La reforestación y el aumento concomitante de ciervos y ratones (el hospedador natural de *Borrelia burgdorferi*, agente etiológico de la enfermedad), han dado como resultado un aumento en el número de garrapatas infectadas, el artrópodo vector (*véase* Sección 27.4). Además es creciente el número de personas que están construyendo casas y realizando actividades recreativas cerca de los bosques o dentro de ellos, con lo que aumenta el contacto entre las garrapatas infectadas y las personas y, en consecuencia, aumenta la incidencia de la enfermedad.

Los viajes y el comercio internacionales pueden afectar también la dispersión de los patógenos. Por ejemplo, los filovirus (familia *Filoviridae*), un grupo de virus con ácido ribonucleico (RNA), causan fiebres que culminan en una enfermedad hemorrágica en los hospedadores infectados. Generalmente tienen una tasa de mortalidad superior al 20%. La mayoría de los brotes de esta enfermedad han estado restringidos al Africa ecuatorial central, donde sin duda todavía viven hospedadores y vectores naturales no identificados. Los viajes de huéspedes potenciales desde o a las zonas endémicas, en general están implicados en la transmisión de la enfermedad. Por ejemplo, uno de estos virus fué importado a Marburg, Alemania, en un barco que transportaba monos verdes africanos, una especie que se utiliza para investigación en el laboratorio. El virus pasó rápidamente desde el primate vector a algunas de las personas que los manejaban. Inicialmente se infectaron veinticinco personas y otras seis más desarrollaron la enfermedad al estar en contacto con los casos humanos. A consecuencia de este brote, murieron siete personas, por lo cual el virus se conoce con el nombre de virus Marburg. Otro cargamento de monos de laboratorio que viajaba por barco llevó un filovirus a los Estados Unidos. Al menos cuatro personas de las que trabajaban con los monos importados se infectaron con el ahora llamado virus Reston (el nombre se debe a Reston, Virginia, el lugar en donde surgió el brote). El virus Reston era sumamente contagioso y se propagó por todos los monos, probablemente por la via respiratoria. Sin embargo, sólo se infectaron cuatro personas y ninguna desarrolló una enfermedad clínica. Afortunadamente, este virus no causó una enfermedad humana importante. Estos dos filovirus están estrechamente rela-

Tabla 25.5 Algunas enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes

Agente	Enfermedad y síntomas	Modo de transmisión	Causa(s) de la emergencia
Bacterias, Rickettsias y Clamidias			
Bacillus anthracis	Carbunco: distrés respiratorio, hemorragias	Inhalación o contacto con esporas	Bioterrorismo
Borrelia burgdorferi	Enfermedad de Lyme: exantema, fiebre, alteraciones neurológicas y cardíacas, artritis	Picadura de la garrapata *Ixodes* infectiva	Aumento de ciervos y de población humana en zonas de bosque
Campylobacter jejuni	Enteritis por *Campylobacter*: dolor abdominal, diarrea, fiebre	Ingestión de alimentos, agua o leche contaminados; transmisión fecal-oral desde una persona o animal infectados	Mayor reconocimiento; consumo de aves poco cocinadas
Chlamydia trachomatis	Tracoma, infecciones genitales, conjuntivitis, neumonía infantil	Unión sexual	Aumento de la actividad sexual, cambios en la higiene
Escherichia coli 0157:H7	Colitis hemorrágica: trombocitopenia, síndrome hemolítico urémico	Ingestión de alimentos contaminados, especialmente carne de vacuno poco hecha y leche cruda	Desarrollo de un nuevo patógeno
Haemophilus influenzae biogupo *aegyptus*	Fiebre púrpura del Brasil: conjuntivitis purulenta, fiebre, vómitos	Descargas de personas infectadas; se sospecha que las moscas actúan de vectores	Posible incremento de la virulencia, debido a mutación
Helicobacter pylori	Gastritis, úlceras pépticas, posible cáncer de estómago	Alimentos o agua contaminados, especialmente leche no pasteurizada; contacto con animales de compañía infectados	Mayor reconocimiento
Legionella pneumophila	Enfermedad de los Legionarios: malestar, dolor muscular, fiebre, dolor de cabeza, alteraciones respiratorias	Sistemas de refrigeración del aire y abastecimientos de agua	Reconocimiento en una situación epidémica
Mycobacrerium tuberculosis	Tuberculosis: tos, pérdida de peso, lesiones pulmonares ;la infección se puede extender a otros sistemas de órganos	Gotitas de esputo (exhaladas al toser o estornudar) de una persona con la enfermedad activa	Inmunosupresión, inmunodeficiencia
Neisseria meningitides	Meningitis bacteriana	Contacto persona a persona	Urbanización, falta de vigilancia de salud pública local
Staphylococcus aureus	Abscesos, neumonía, endocarditis, choque tóxico	Contacto con el organismo que está en una lesión purulenta o en las manos	Reconocimiento en una situación epidemica; posibilidad de mutación
Streptococcus pyogenes	Escarlatina, fiebre reumática, choque tóxico	Contacto directo con personas infectadas o con portadores; ingestión de alimentos contaminados	Cambios de virulencia de las bacterias; posibilidad de mutación
Vibrio cholera	Cólera: fuerte diarrea, rápida deshidratación	Agua contaminada con heces de personas infectadas; alimentos expuestos a agua contaminada	Sanidad e higiene deficientes; introducido posiblemente a través de las aguas de pantoque en barcos de carga
Virus			
Dengue	Fiebre hemorrágica	Picadura de un mosquito infectado (primordialmente *Aedes aegypti*)	Escaso control de los mosquitos, aumento de la urbanización en los trópicos, aumento de los viajes aéreos
Filovirus (Marburg, Ébola)	Fiebre hemorrágica fulminante, elevada mortalidad	Contacto directo con sangre, órganos, secreciones o semen infectados	Desconocidas; en Europa y en los Estados Unidos, monos enviados por via aérea desde paises en desarrollo.
Hantavirus	Dolor abdominal, vómitos, fiebre hemorrágica	Inhalación de orina o heces de roedores, en aerosol	Intrusión humana en el nicho ecológico del virus
Hepatitis B	Naúseas, vómitos, ictericia; la infección crónica conduce a cáncer hepatocelular y cirrosis.	Contacto con saliva, semen, sangre o fluidos vaginales de una persona infectada; no se conoce el modo de transmisión a los niños	Probablemente, la mayor actividad sexual y el abuso de drogas intravenosas; las transfusiones (antes de 1978).
Hepatitis C	Naúseas, vómitos, ictericia; la infección crónica conduce a carcinoma hepatocelular y cirrosis	Exposición (percutánea) a sangre o plasma contaminados; transmisión sexual	Reconocimiento a través de aplicaciones de virología molecular; prácticas de transfusión de sangre, especialmente en el Japón

Tabla 25.5 Algunas enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes *(continuación)*

Agente	Enfermedad y síntomas	Modo de transmisión	Causa(s) de la emergencia
Virus *(continuación)*			
Hepatitis E	Fiebre, dolor abdominal, ictericia	Agua contaminada	Recién reconocido
Virus de la inmunodeficiencia humana: VIH-1 y VIH-2	Enfermedades por los VIH, incluído el SIDA: grave disfunción del sistema inmunitario, infecciones oportunistas	Contacto sexual con, o exposición a la sangre o tejidos de una persona infectada; transmisión vertical	La urbanización; cambios en el estilo de vida y costumbres; incremento del uso de drogas intravenosas; viajes internacionales; tecnología médica (transfusiones y transplantes)
Virus del papiloma humano	Lesiones de la piel y de las membranas mucosas (con frecuencia verrugas); fuertemente ligados al cáncer de cérvix y de pene	Contacto directo (contacto sexual o contacto con superficies contaminadas)	Recientemente reconocida; quizás los cambios en el estilo de vida sexual
Virus linfotrópico humano (HTLV-I y HTLV-II)	Leucemias y linfomas	Transmisión vertical a través de la sangre o la leche materna; exposición a productos de la sangre contaminados; transmisión sexual	Incremento del abuso de drogas intravenosas; la tecnología médica (transfusión, transplante)
Virus de la gripe pandémico	Fiebre, dolor de cabeza, tos, neumonía	Transmitida por el aire; especialmente en recintos cerrados y aglomeraciones de gente	Reordenamiento de los virus animal-humano; desplazamiento antigénico
Virus Lassa	Fiebre, dolor de cabeza, dolor de garganta, náuseas	Contacto con orina o heces de animales contaminados	Urbanización y condiciones que favorecen la infestación con roedores
Virus del sarampión	Fiebre, conjuntivitis, tos, exantema de puntos rojos	Transmitido por el aire; contacto directo con secreciones respiratorias de personas infectadas	Deterioro de la infraestructura sanitaria en la que se apoya la inmunización
Viruela de mono	Exantema, linfoadenopatía, distrés pulmonar	Contacto directo con primates infectados	Viajes a zonas endémicas, consunción y manejo de primates infectados
Agentes Norwalk y afines	Gastroenteritis; diarrea epidémica	El más probable, el fecal-oral; entre los vehículos pueden estar el agua de bebida y de las piscinas y alimentos sin cocinar	Aumento de reconocimiento
Rabia	Encefalomielitis vírica aguda	Mordedura de un animal rabioso	Introducción de huéspedes reservorios, en nuevas zonas
Virus del Rift Valley	Estado febril	Picadura de un mosquito infectivo	Importación de mosquitos y otros animales infectados; el desarrollo (pantanos, sistemas de riego)
Rotavirus	Enteritis: diarrea, vómitos, deshidratación, fiebre baja	Primordialmente fecal-oral; también puede ser fecal-respiratoria	Aumento de reconocimiento
Encefalitis equina venezolana	Encefalitis	Picadura de mosquito infectivo	Desplazamientos de los mosquitos y los huéspedes (caballos)
Virus del oeste del Nilo	Meningitis y encefalitis	Mosquito *Culex pipens* y aves	Desarrolo de la agricultura, incremento de las areas de apareamiento de mosquitos
Fiebre amarilla	Fiebre, dolor de cabeza, dolor muscular, náuseas, vómitos	Picadura de un mosquito infectado (*Aedes aegypti*)	Falta de control de los mosquitos y de una adecuada vacunación; urbanización en los trópicos; aumento de los viajes por via aérea
Protozoos y hongos			
Candida	Candidiasis: infección fúngica del tracto gastrointestinal, vagina y cavidad oral	La flora endógena; contacto con secreciones o excreciones de personas infectadas	Inmunosupresión; prácticas médicas (catéteres) y uso de antibióticos
Crytococcus	Meningitis: algunas veces infecciones de los pulmones, riñones, próstata e hígado	Inhalación	Inmunosupresión
Cryotosporidium	Criptosporidiosis: infección de las células epiteliales de los tractos gastrointestinal y respiratorio	Fecal-oral, de persona a persona, a través del agua	Desarrollo cerca de zonas inundadas; inmunosupresión
Giardia lambia	Giardiasis: Infección de la parte superior del intestino delgado, diarrea, hinchamiento	Ingestión de alimentos o agua contaminados con heces	Control inadecuado de algunos abastecimientos de agua; inmunosupresión; viajes internacionales

(continúa)

Tabla 25.5 Algunas enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes *(continuación)*

Agente	Enfermedad y síntomas	Modo de transmisión	Causa(s) de la emergencia
Protozoos y hongos ***(continuación)***			
Microsporidia	Alteraciones gastrointestinales, diarrea; debilitamiento en personas inmunodeprimidas	Se desconoce; probablemente la ingestión de alimentos o agua contaminados con heces	Inmunosupresión; reconocimiento
Plasmodium	Paludismo	Picadura de un mosquito *Anopheles* infectivo	Urbanización; cambios en la biología del parásito; cambios en el medio ambiente; resistencia a las drogas; viajes aéreos
Pneumocystis carinii (es un hongo)	Neumonía aguda	Desconocido; posiblemente la reactivación de una infección latente	Inmunosupresión
Toxoplasma gondii	Toxoplasmosis: Fiebre, linfoadenopatías, linfocitosis	Exposición a heces de gatos que llevan el protozoo; a veces a través de los alimentos	Inmunosupresión; aumento de gatos como animales de compañía
Otros agentes			
Priones bovinos	Encefalitis espongiforme bovina (animales y humanos)	A través de los alimentos	Comer carne contaminada

cionados con el virus Ebola (Tabla 25.5 y Figura 25.12). Los últimos brotes del Ebola en Africa Central, caracterizados por tasas de mortalidad superiores al 50%, han puesto de nuevo de manifiesto la existencia de patógenos humanos muy virulentos, frente a los cuales no existe o es muy pequeña la inmunidad. Mediante los viajes aéreos, estos patógenos podrían diseminarse por todo el mundo en cuestión de días. Un sólo agente que combine una via de transmisión altamente contagiosa, como es la ruta respiratoria del virus Reston, con la elevada tasa de mortalidad del virus Ébola, podría desencadenar una importante pandemia capaz de devastar en unas semanas, centros de población de todo el mundo.

La adaptación y los cambios microbianos contribuyen también a la emergencia de patógenos. Por ejemplo, casi todos los virus con RNA, incluidos el virus de la gripe y el de la inmunodefiencia humana (VIH), sufren mutaciones genéticas. Estos virus carecen de mecanismos de corrección en los distintos pasos de la replicación y por ello, incorporan mutaciones genómicas a un ritmo extremadamente elevado, en comparación con la mayoría de los virus con DNA: Los virus con RNA están considerados como causantes de graves problemas epidemiológicos, debido a que sus genomas están en constante cambio.

Las bacterias también poseen mecanismos genéticos que exaltan la virulencia y promueven la emergencia de nuevas epidemias. Un grupo de mecanismos exaltadores de la virulencia son los elementos genéticos móviles: bacteriófagos, plásmidos y transposones (*véanse* Secciones 16.1-16.5, 10.8 y 10.11). La Tabla 25.6 muestra algunos factores de virulencia representativos, que son transportados en estos elementos genéticos móviles y contribuyen a la emergencia de patógenos.

La resistencia a los antibióticos es también un importante factor en la reaparición de patógenos bacterianos (*véase* Sección 20.12) y de las enfermedades víricas. La resistencia a los antibióticos es además, un factor de emergencia de virus. Aunque algunas drogas son eficaces frente a ciertas enfermedades víricas (*véase* Sección 20.10), la resistencia a estos fármacos es muy común, especialmente entre los virus con RNA. Por ejemplo, la mayoría de las cepas del VIH desarrollan muy rápidamente resistencia a la azidotimidina (AZT), a no ser que se utilice en combinación con otros antirretrovíricos (*véase* Sección 26.14).

El quebrantamiento de las medidas de sanidad pública es, a veces, responsable de la emergencia o del resurgimiento de enfermedades. Por ejemplo, el cólera (causado por *Vibrio cholerae, véase* Sección 28.5) puede controlarse adecuadamente, incluso en zonas endémicas, mediante medidas higiénicas adecuadas, especialmente en los suministros de agua. Sin embargo, la contaminación de los abastecimientos municipales de agua en el Perú, condujo en 1991 a una importante pandemia de cólera en América (*véase* Sección 28.5). En otro caso, en 1993, el abastecimiento municipal de agua en Milwaukee, Wisconsin; se contaminó con el protozoo *Cryptosporidium* que implicó a unas 400 000 personas, 4000 personas estuvieron hospitalizadas. La contaminación dió como resultado 370 000 casos de una dolencia intestinal, de los que 4000 precisaron hospitalización. Se necesitaron tratamientos más eficaces, incluído el reforzamiento de los sistemas de filtración, para que el abastecimiento de agua quedase libre del patógeno (*véase* Sección 28.6).

Los programas de vacunación inadecuados son una importante causa del resurgimiento de algunas enfermedades que previamente se habían controlado. Por ejemplo, los recientes brotes de difteria (causada por *Corynebacterium diphtheriae*) (*véase* Sección 26.3) en la antigua Unión Soviética, son el resultado de una inadecuada inmunización de los niños susceptibles, debido a que se destruyó la antigua infraestructura centralizada de sanidad pública. La tos ferina (causada por *Bordetella pertussis*) (*véase* Sección 26.4), otra enfermedad respiratoria de la infancia, que se puede evitar con la vacuna, ha aumentado recientemente en Europa del este.

Por último, *los hechos naturales anormales,* como los rápidos cambios ambientales y climáticos, alteran a veces el equilibrio habitual hospedador-patógeno. Por ejemplo, el hantavirus es un bien conocido patógeno humano que exis-

Tabla 25.6 Factores de virulencia codificados por bacteriófagos, plásmidos y transposones a'

Elemento genético	Organismo	Factores de virulencia
Bacteriófago	*Streptococcus pyogenes*	Toxina eritrogénica
	Escherichia coli	Toxina tipo Shiga
	Staphylococcus aureus	Enterotoxinas A,D,E, estafiloquinasa, toxina 1 del síndrome del choque tóxico (TSST-1)
	Clostridium botulinum	Neurotoxinas C, D, E
	Corynebacterium diphtheriae	Toxina diftérica
Plásmido	*Escherichia coli*	Enterotoxinas, factor de colonización de los pili, hemolisina, ureasa, factor de resistenca sérico, factores de adherencia, factores de invasión celular
	Bacillus anthracis	Factor edema, factor letal, antígeno protector, cápsula de poli-D-ácido glutámico
	Yersinia pestis	Coagulasa, fibrinolisina, toxina murina
Transposón	*Escherichia coli*	Enterotoxinas termoestables, sideróforos de aerobactina, operones de los pili y de la hemolisina
	Shigella dysenteriae	Toxina Shiga
	Vibrio cholerae	Toxina del cólera

[a] For discussion of bacteriophages, plasmids, and transposons, see Sections 9.8-9.10 and 16.1-16.5, 10.8, and 10.11, respectively.

te en muchas poblaciones de roedores, incluso en animales de laboratorio (*véase* Sección 27.2). Sin embargo, en 1993 se registraron varios casos letales de infección por hantavirus en el sudoeste de América y se relacionaron con el hecho de haber estado expuestos a excrementos de animales salvajes. Las lluvias abundantes que coincidieron con una larga estacion otoñal y un invierno suave, causaron un enorme incremento en el número de ratones; prácticamente todos los que adquirían la infección habían estado expuestos a roedores o a sus excrementos.

Como estudiar y tratar las enfermedades emergentes

Muchas de las enfermedades emergentes que hemos estudiado estan ausentes del la lista de enfermedades de declaración obligatoria en los Estados Unidos (Tabla 25.3). ¿Cómo pueden entonces, los encargados de la sanidad pública definir y tratar las enfermedades emergentes, para evitar epidemias importantes? Las características claves para estudiar y tratar las enfermedades emergentes son el *reconocimiento* de la enfermedad y la *intervención* para evitar la extensión de la enfermedad.

El primer paso en el *reconocimiento* de una enfermedad, es la *vigilancia*. Las enfermedades *epidémicas* que presentan *síndromes clínicos* particulares garantizan una intensiva vigilancia de la sanidad pública. Estos síndromes son (1) enfermedades respiratorias agudas, (2) encefalitis y meningitis aséptica, (3) fiebre hemorrágica, (4) diarreas agudas, (5) agrupamiento de varios casos de fiebre alta, (6) agrupamiento no habitual de casos de una enfermedad o de muertes y (7) resistencia al tratamiento con los fármacos comunes. Por tanto, las nuevas enfermedades pueden reconocerse a causa de su incidencia epidémica, por el agrupamiento de casos y por los síndromes. Cuando se reconoce la prevalencia y patología de una enfermedad emergente, se añade a la lista de enfermedades de declaración obligatoria. Por ejemplo, el SIDA se reconoció como enfermedad en 1981 y se añadió a la lista de enfermedades de declaración obligatoria en 1984. La enfermedad de Lyme se reconoció por primera vez e como enfermedad clínica distinta, en los años 1980 y se incorporó a la lista en 1991. Del mismo modo, los brotes de una enfermedad gastrointestinal debidos a la cepa enteropátógena *Escherichia coli* O157:H7 han ido aumentando durante los últimos años y la cepa se ha añadido a la lista de causantes de enfermedades de declaración obligatoria en 1995.

La intervención para evitar que las infecciones emergentes se propaguen debe ser una respuesta de la sanidad pública, que implica toda una variedad de métodos. Las estrategias de tipo general, como el reforzamiento de las medidas del sistema de sanidad pública y el apoyo a la investigación y al adiestramiento son de utilidad, pero para controlar los brotes individuales se precisa una intervención específica relacionada con la enfermedad. Los métodos de la sanidad pública como la cuarentena e inmunización y el tratamiento con drogas debe ser aplicado para parar los brotes de determinadas enfermedades. Finalmente, hay un cierto número de enfermedades emergentes que se propagan en hospedadores no humanos o en vectores. Debemos identificar los hospedadores alternantes y los vectores y desarrollar medios para intervenir en el ciclo biológico del patógeno, con el fin de evitar la propagación de la enfermedad a los humanos.

✓ 25.10 Revisión de conceptos

Los cambios en las condiciones del hospedador, del vector o del patógeno, tanto naturales como artificiales, pueden dar como resultado condiciones que alientan la emergencia explosiva de ciertas enfermedades infecciosas. La vigilancia global y los programas de intervención deben mantenerse y reforzarse para evitar nuevas importantes epidemias y pandemias

- ✓ ¿Qué factores son importantes en la emergencia o resurgimiento de patógenos potenciales?
- ✓ Indique qué métodos generales y específicos serían útiles para manejar enfermedades infecciosas que están emergiendo actualmente.

25.11 Guerra biológica (bioterrorismo) y armas biológicas

El término **guerra biológica** se refiere a la utilización de agentes biológicos con el fin de incapacitar o matar a la población militar o civil, en un acto de guerra o de terrorismo. La guerra biológica está recibiendo una atención pública especial porque se sabe, o se sospecha, de la existencia o posesión de armas biológicas e instalaciones para producirlas, en manos de algunos gobiernos y grupos terroristas.

Características de las armas biológicas

Las armas biológicas deben ser agentes biológicos tales como bacterias o toxinas que son: (1) de fácil producción y distribución, (2) de uso seguro para los soldados atacantes, y (3) capaces de incapacitar o matar a los induviduos en un ataque de forma reproducible y eficaz. Muchos organismos o toxinas biológicas cumplen estos criterios generales y comentaremos algunos de éstos más adelante.

Aunque las armas biológicas son potencialmente útiles en manos de las fuerzas militares convencionales, la probabilidad de que sean usadas por grupos terroristas es mucho mayor. Esto es debido, en parte, a que cualquier microbiólogo bien formado posee los conocimientos prácticos necesarios para el cultivo y producción de muchos de los organismos usados como armas biológicas; las armas biológicas son accesibles casi para cualquier gobierno y organización privada con una financiación media.

Candidatos para la obtención de armas biológicas

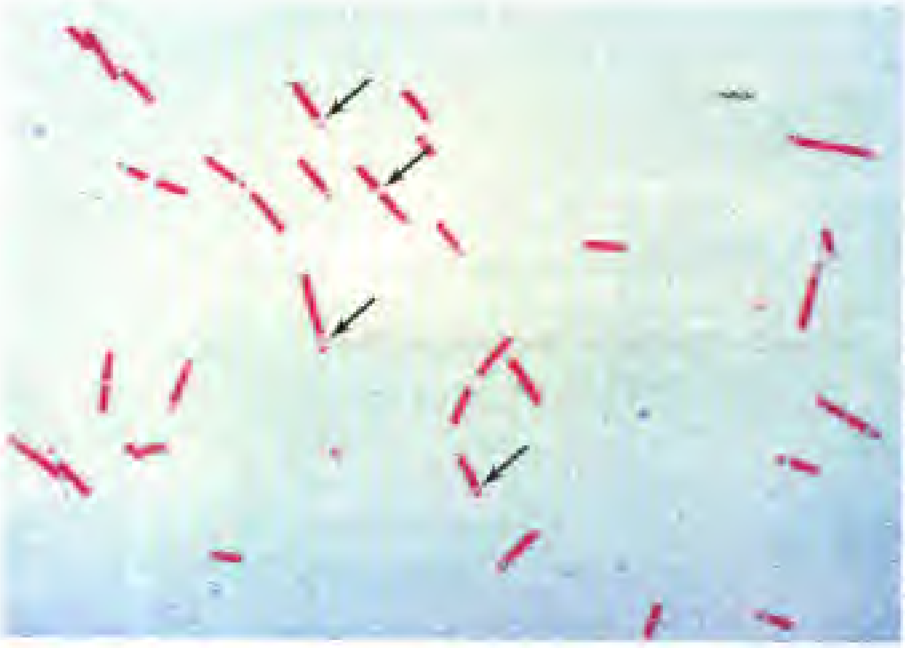
Prácticamente todas las bacterias patógenas o los virus son potencialmente útiles en la guerra biológica, y algunos de los mejores candidatos son organismos relativamente fáciles de cultivar y distribuir. El organismo más mencionado comúnmente es *Bacillus anthracis*, el agente etiológico del carbunco (N. del R.: en inglés, el término *anthrax* se usa tanto para la afección maligna (*malignant anthrax*) producida por *Bacillus anthracis* como para la afección benigna (*mild anthrax*) producida por *Staphylococcus aureus*; mientras que en español, se reserva el término *carbunco* para *Bacillus anthracis* y *ántrax* para *Staphylococcus aureus*, por razones históricas, anatomo-patognomónicas y etiológicas). *B. anthracis* produce endosporas (*véanse* Secciones 4.15 y 12.20) que, cuando se dispersan en aerosoles, pueden constituir una forma muy eficaz de distribución de la bacteria (Figura 25.13). La inhalación de las esporas o de la bacteria produce infecciones pulmonares con una tasa de mortalidad de casi el 100% sin tratamiento con antibióticos, produciendo hemorragias pulmonares y cerebrales (Figura 25.14).

El virus de la viruela (*véase* Sección 16.12) es otro de los agentes potenciales que se podrían usar en bioterrorismo. Aunque se dispone de una vacuna muy eficaz contra la viruela, no se ha utilizado en los últimos 23 años dado que la viruela fue declarada erradicada en el mundo hace más de 20 años, en 1980. Por esta razón, alrededor del 90% de la población mundial actual no está vacunada y es susceptible de adquirir la enfermedad. ¿Podrían tener acceso al virus de la viruela los grupos terroristas o incluso las fuerzas armadas convencionales? Actualmente aún se mantienen algunos stocks del virus de la viruela en Estados Unidos y en la anterior Unión Soviética.

Otras bacterias que podrían ser candidatas como armas biológicas son: *Yersinia pestis*, el agente etiológico de la peste (*véase* Sección 27.6), *Brucella abortus* (productor de fiebre y bacteriemia), *Francisella tularensis* («fiebre de los conejos») y *Salmonella* (causante de enfermedades transmitidas por el agua y los alimentos) (*véase* sección 29.6).

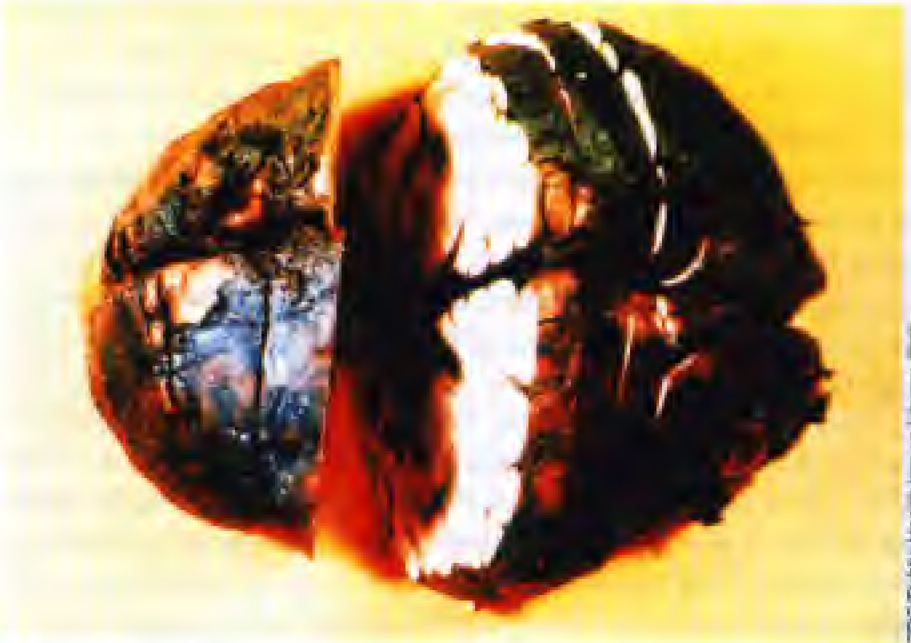
Entre los los patógenos víricos como posibles armas biológicas se encuentran el virus de la rabia (*véase* Sección 27.1) y el virus Ébola (Sección 25.10). Estos agentes causan enfermedades con altas tasas de mortalidad en pocos días o semanas tras la exposición al agente.

Las toxinas bacterianas tales como la toxina botulínica producida por *Clostridium botulinum* también podrían ser usadas como armas biológicas (*véanse* Secciones 21.10 y 29.5). Grandes cantidades de toxina distribuidas entre la



CDC/Public Health Image Library, PHIL.

Figura 25.13 Tinción de Gram de *Bacillus anthracis*. *B. anthracis* es un bacilo formador de esporas Gram positivo (Sección 12.20). Note la formación de esporas (flechas). La formación de esporas (Sección 4.15) promueve la habilidad de diseminarse, en aerosoles.



CDC/Public Health Image Library, PHIL.

Figura 25.14 Sección fijada de cerebro monstrando meningitis hemorrágica (coloración oscura), debida a un caso fatal de inhalación de carbunco.

población a través de del agua de abastecimiento podrían tener consecuencias devastadoras. La dosis letal de la toxina botulínica para el hombre es inferior a 2 μg.

Exposición a armas biológicas

La mayoría de los organismos que pueden usarse como armas biológicas pueden dispersarse en aerosoles, diseminándose de forma simple, rápida y generalizada, y produciendo infección. Examinemos algunos ejemplos de exposiciones a aerosoles.

Uno de los últimos casos de viruela en un país desarrollado ocurrió en Alemania en 1962. Un trabajador alemán padeció viruela al volver de Pakistán, uno de los países donde la viruela era endémica en esa época. El individuo fue hospitalizado inmediatamente y sometido a cuarentena, pero el paciente tenía tos y el virus se dispersó en los aerosoles producidos al toser, causando la enfermedad en 19 personas *vacunadas*; por lo menos una de las personas murió como resultado de la infección.

En otro accidente, las esporas de *Bacillus anthracis* fueron liberadas en la atmósfera accidentalmente en una instalación de fabricación de armas biológicas en Sverdlovsk, Rusia, en 1979. Menos de un gramo de esporas fueron dispersadas y todas las personas de la zona próxima a la instalación fueron inmunizadas y sometidas a una quimioterapia preventiva (con antibióticos) tan pronto como se diagnosticó el primer caso de carbunco. No obstante, 77 personas externas a la instalación contrajeron carbunco pulmonar y 66 murieron.

Ya han ocurrido ataques bioterroristas. En 1984 en Dalles, Oregon (Estados Unidos), los miembros de una secta (N. del R.: secta de los rajinistas) contaminaron ensaladas con *Salmonella typhimurium* en 10 restaurantes locales, produciéndose 751 casos de salmonelosis transmitida por alimentos (N. del R.: Brote de gastroenteritis conocido comúnmente como «rajinosis»), en una región en la que habitualmente se registran menos de 10 casos de salmonellosis anuales (*véase* Sección 29.6). En 1995, un grupo político radical dispersó el gas nervioso Sarin en el metro de Tokio, matando a varias personas e hiriendo gravemente a otras. Aunque en este caso se tratase de un arma química, dicho grupo también poseía cultivos de carbunco, medios de cultivo bacteriológicos, aeroplanos fumigadores y tanques pulverizadores.

La exposición de grandes poblaciones a toxinas bacterianas previamente sintetizadas es impracticable, porque las exotoxinas más potentes son proteínas y podrían perder su eficacia a medida que se diluyen o se destruyen en medios como el agua de abastecimiento.

Prevención y respuesta a las armas biológicas

Ya se han iniciado medidas activas contra las armas biológicas, intentando actualizar los acuerdos internacionales de la Convención de Armas Tóxicas y Biológicas de 1972. En la práctica, los gobiernos están financiando la producción a gran escala y la distribución de vacunas, y desarrollando planes estratégicos y tácticos para prevenir y contrarrestar los efectos de las armas biológicas. El bioterrorismo es una amenaza real en un mundo donde los viajes internacionales son cotidianos y la información técnica fácilmente accesible.

✓ 25.11 Revisión de conceptos

Los agentes biológicos infecciosos pueden ser usados como armas biológicas temporalmente por fuerzas militares o por grupos terroristas. Los aerosoles son la forma más común de diseminación. Las medidas de prevención se basan en una infraestructura de salud pública bien preparada.

✓ ¿Qué características hacen de *Bacillus anthracis* un organismo especialmente útil como arma biológica?

✓ Identifique otros dos agentes infecciosos que pudieran ser usados como armas biológicas eficaces. ¿Cómo podrían diseminarse estos agentes?

Preguntas de repaso

1. Haga una lista de las 5 causas más comunes de muerte debidas a enfermedades infecciosas, en todo el mundo. ¿Se pueden prevenir estas enfermedades por inmunización?
2. Distinga entre *morbilidad* y *mortalidad*, *prevalencia* e *incidencia*, *epidemia* y *pandemia*, cómo se relacionan estos términos con las enfermedades infecciosas.
3. Explique la diferencia entre un portador *crónico* y un portador *agudo* de una enfermedad infecciosa.
4. De algunos ejemplos de la transmission de una enfermedad de hospedador a hospedador por contacto directo. Indique ejemplos de enfermedades que se transmiten de hospedador a hospedador por contacto indirecto.
5. ¿Cómo una proporción grande de la población que está protegida por inmunidad protege a los miembros no inmunes de la población? ¿Sería utilizable este método para una enfermedad que se transmite por el agua? ¿Por qué sí o por qué no?
6. Identifique los principales factores de riesgo para adquirir una infección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en los Estados Unidos. ¿Este patrón se ajusta a todas las regiones geográficas?
7. Los hospitales son ambientes especialmente peligrosos para la dispersión de enfermedades infecciosas. Haga una revisión de las causas que favorecen una mayor difusión de las infecciones en los hospitales. ¿Cuáles son las causas de las infecciones nosocomiales?
8. Describa los medios médicos y de salud pública desarrollados en el siglo XX que fueron determinantes para el control de las enfermedades infecciosas en los países desarrollados.
9. Compare el papel de las enfermedades infecciosas en la mortalidad, en los países desarrollados y en los países en desarrollo.
10. Muchos factores que pueden controlar la extensión de una enfermedad son importantes consideraciones para el personal de la sanidad pública. Describa los principales métodos utilizados para identificar y controlar la difusión de las enfermedades infecciosas.
11. Describa las propiedades generales de un agente biológico para la guerra biológica. ¿Cómo *Bacillus anthracis* cumple estas características?

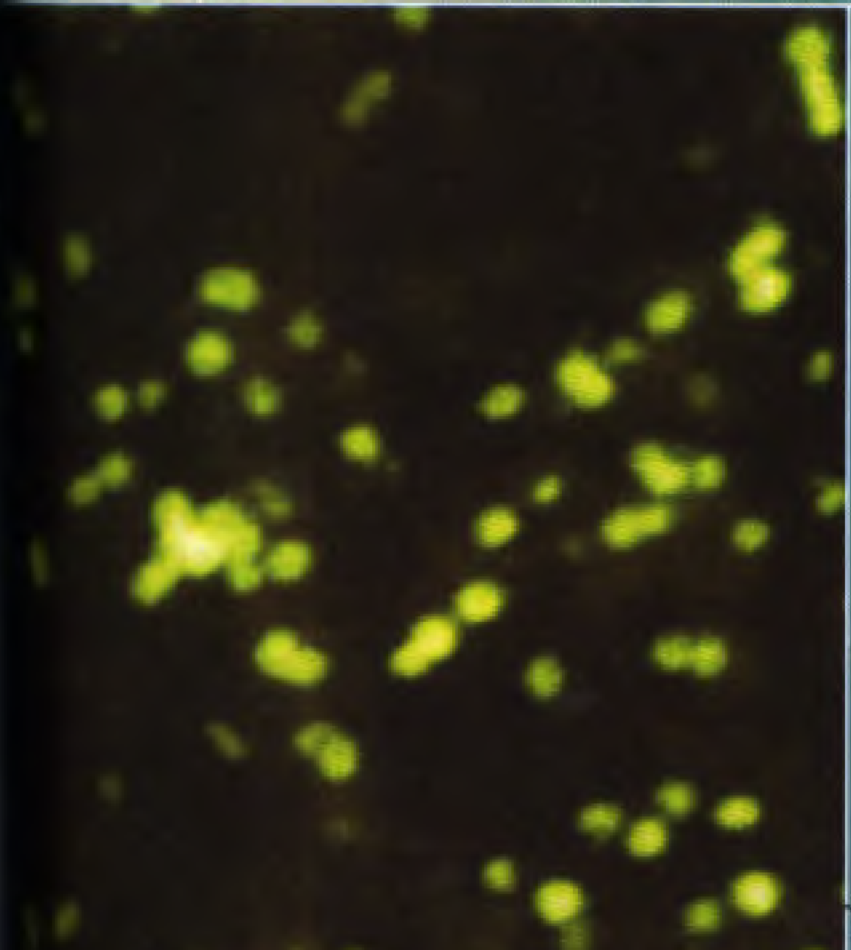
Ejercicios prácticos

1. ¿Cómo obtendría un epidemiólogo los datos relativos a una potencial epidemia con un origen común? ¿De qué recursos dispone normalmente el epidemiólogo y qué recursos deben incrementarse para definir mejor los brotes graves de enfermedades infecciosas?
2. Si una enfermedad infecciosa causa una elevada *mortalidad*, la *morbilidad* puede ser muy baja. Por el contrario, las enfermedades caracterizadas por una alta morbilidad, con frecuencia inducen una mortalidad baja. Explique estas afirmaciones y presente ejemplos que apoyen o refuten su explicación. ¿Puede usted identificar algunas enfermedades infecciosas como el tétanos (*véase* Sección 27.8) y la amebiasis (*véase* Sección 28.8) que se ajusten a estas generalizaciones?
3. La viruela, una enfermedad que estaba limitada a las personas, fue erradicada. La peste, una enfermedad con reservorio zoonótico en los roedores (Tabla 25.2), nunca será erradicada. Explique estas afirmaciones y por qué usted está o no está de acuerdo con la posibilidad de erradicar la peste. Podría usted eliminar la peste en ambientes limitados, es decir, en ciudades. Utilice métodos que impliquen al reservorio, al patógeno y al hospedador.
4. La transmisión de muchas enfermedades epidémicas es de hospedador a hospedador, en tanto que otras epidemias se difunden a través de un origen común. Algunas epidemias pueden extenderse por ambos caminos. Explique cómo podría suceder esto, utilizando agentes infecciosos específicos (al menos una bacteria y un virus) como ejemplos.
5. ¿Cuál es la principal ventaja de la coevolucion patógeno-hospedador, en términos de supervivencia de la especie? ¿Es beneficioso para el patógeno, causar una elevada mortalidad en el hospedador? ¿Por qué si o por qué no?¿Qué enfermedades de la Tabla 25.2 han causado gran mortalidad? Compare su reservorio o vector con los de enfermedades de baja mortalidad.
6. Se considera que la transmisión del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es de persona a persona por fluidos corporales. ¿Cómo determinaron los epidemiólogos este hecho? El SIDA es un candidato como enfermedad que puede ser eliminada porque se propaga por contacto de persona a persona y no se conocen reservorios animales. Diseñe un programa para la eliminación del SIDA en un pais desarrollado y en un pais en desarrollo. ¿En qué se diferenciarían estos programas? ¿Qué factores actuarían en contra del exito de su programa, tanto en términos de comportamiento humano como debidos a la propia enfermedad del SIDA? ¿Por qué los números de infectados por VIH y pacientes de SIDA continuan creciendo en los países en desarrollo?
7. ¿ Por qué las enfermedades debidas a organismos de una determinada especie, resistentes a los antibióticos, son más comunes en el ambiente hospitalario que en la población general? ¿Por qué las enferemedades causadas por la flora normal (microbiota) como *Staphylococcus* son más comunes en el ambiente hospitalario que en la población general? ¿Qué precauciones especiales deben tomarse al diagnosticar y tratar enfermedades infecciosas, en un complejo hospitalario?
8. Cómo el funcionario de la sanidad pública, usted se enfrenta a una epidemia con un origen común y usted cree que el origen está en el abastecimiento municipal de agua. ¿Como utilizaría usted sus recursos, para detener la epidemia? No se centre en el tratamiento de la enfermedad a menos que usted, como funcionario de la sanidad pública, crea que el tratamiento podrá detener la difusión de la enfermedad. Haga una relación con los pasos a seguir en orden de prioridad. Haga el mismo ejercicio para un caso de epidemia originada de hospedador a hospedador, para la que se dispone de vacunas y agentes quimioterapeúticos.
9. Viajar a los paises en desarrollo implica ciertos riesgos de exposición a enfermedades infecciosas. ¿Qué precauciones generales debería usted tomar antes, durante y después de visitar los paises en desarrollo? ¿Dónde puede usted obtener información acerca del estado de las enfermedades infecciosas en un pais extranjero determinado? Cuando usted regresa de un país extranjero, ¿constituye usted un riesgo de enfermedad para su familia o compañeros? Explíquelo.
10. Aunque pueden estar implicados muchos factores en la emergencia de una enfermedad infecciosa, algunas enfermedades se desarrollan hasta convertirse en pandemias, en tanto que otras nunca pasan de ser epidemias localizadas. Ejemplos de esto son las infecciones del VIH y del virus Ébola, ambas identificadas en los últimos veinte años. ¿Qué factores comparten estos virus que conducen a su emergencia? ¿Qué factores específicos causan diferencias para la difusión de estas enfermedades, por qué estos factores a nivel mundial la dispersión del VIH, mientras que limitan la dispersión del Ébola en sitios muy limitados y aislados?
11. Identifique un patógeno que sea eficaz para la guerra biológica. Describa las propiedades del patógeno en el contexto de utilizarlo como arma biológica. Describa las condiciones para crecer grandes cantidades del patógeno. Identifique un factor de difusión del patógeno, describa las precauciones que tomaría usted mismo para protegerse del patógeno. Ahora revierta su papel. Cómo un componente de salud pública en una gran ciudad, describa cómo reconocería y diagnosticaría la enfermedad causada por el agente. Indique los remedios que tomaría para tratar la enfermedad causada por el agente. ¿Cómo limitaría el daño causado por el agente? ¿Podrían la cuarentena y el aislamiento ser útiles? ¿Cómo podrían la inmnunización y los antibióticos ser útiles?

Las enfermedades microbianas infecciosas se transmiten rápidamente de persona a persona entre los miembros de una población que se encuentran muy cerca unos de otros. Por ejemplo, la gripe, el resfriado, incluso la meningitis bacteriana (una enfermedad neurológica grave causada por la bacteria Gram negativa *Neisseria meningitidis*, que se representa aquí), se transmiten rápidamente en colegios, bases militares, hospitales y universidades debido a la proximidad de individiduos infectados con una población de individiduos sensibles a la infección.

26

ENFERMEDADES MICROBIANAS TRANSMITIDAS DE PERSONA A PERSONA



I TRANSMISIÓN DE ENFERMEDADES POR EL AIRE 868

26.1 Transmisión de patógenos por el aire 869
26.2 Enfermedades producidas por *streptococcus* 870
26.3 *Corynebacterium* y difteria 872
26.4 *Bordetella* y tosferina 873
26.5 *Mycobacterium* y tuberculosis 874
26.6 *Neisseria meningitidis*, meningitis y meningococemia 878
26.7 Virus e infecciones respiratorias 879
26.8 Resfriados y gripe 881

II TRANSMISIÓN DE ENFERMEDADES POR CONTACTO DIRECTO 885

26.9 Estafilococos 885
26.10 *Helicobacter pylori* y las úlceras gástricas 886
26.11 Virus que producen hepatitis 887

III ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL 889

26.12 Gonorrea y sífilis 890
26.13 *Chlamydia*, herpes y tricomoniasis 893
26.14 Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) 896

Glosario

Cambios antigénicos grandes cambios en los antígenos debidos a reagrupamientos génicos en el virus de la gripe

Carga vírica valoración cuantitativa de la cantidad de virus que hay en un organismo

Cirrosis destrucción de la arquitectura normal del hígado dando una fibrosis

Deriva antigénica pequeños cambios en los antígenos debidos a mutaciones génicas en el virus de la gripe

Enfermedad de transmisión sexual (STD) enfermedad cuya forma habitual de transmisión es por contacto sexual

Escarlatina característica erupción rojiza como resultado de la presencia de una exotoxina producida por *Streptococcus pyogenes*

Fiebre reumática enfermedad inflamatoria autoinmune producida por una respuesta inmunitaria frente a una infección por *Streptococcus pyogenes*

Hepatitis inflamación del hígado generalmente causada por un agente infeccioso

Ictericia exceso en la producción y liberación de bilirrubina en el hígado, debido a la destrucción de los hepatocitos. El resultado es la coloración amarillenta de la piel y los ojos

Inhibidor de proteasas compuesto que inhibe la proteasa vírica al unirse directamente al sitio catalítico de ésta, evitando la actividad catalítica de la proteasa

Inhibidor no nucleósido de la transciptasa inversa (NRTI) compuesto análogo a los nucleósidos que inhibe la transcriptasa inversa (reversa) de los virus por competición con los nucleósidos

Meningitis inflamación de las meninges (membranas que recubren el cerebro) algunas veces causada por *Neisseria meningitidis* y caracterizada por repentino dolor de cabeza, vómitos y rigidez del cuello, frecuentemente produce coma en pocas horas

Meningococemia enfermedad fulminante causada por *Neisseria meningitidis* caracterizada por septicemia, coagulación intravascular y schock

Sífilis congénita sífilis contraída por un recién nacido a partir de su madre durante el parto

Síndrome de Shock tóxico (TSS) shock sistémico agudo que se produce como resultado de la respuesta del sistema inmunitario a la exotoxina producida por *Staphylococcus aureus*

Test de la tuberculina prueba que se realiza en la piel para detectar si ha existido una infección previa con *Mycobaterium tubercolisis*

En la naturaleza existen al menos 500 000 especies microbianas, probablemente más (Sección 11.7). Solamente unos cuantos cientos de especies están catalogadas como patógenos humanos. La mayor parte de ellos llevan a cabo funciones esenciales para la vida de otros organismos, muchos de ellos estableciendo fuertes y estables relaciones de beneficio mutuo con plantas y animales (Capítulo 19). Sin embargo, las especies patógenas tienen efectos tremendamente negativos en los organismos hospedadores, y por ello han sido profundamente estudiadas. En los siguientes dos capítulos examinaremos ejemplos representativos de patógenos humanos, la prevención, el tratamiento y la patología de las enfermedades que causan. Primeramente dividiremos los patógenos de acuerdo a su modo de transmisión. Después discutiremos sobre enfermedades infecciosas representativas en relación a la ecología del patógeno. En el presente capítulo trataremos sobre enfermedades que se transmiten por contacto directo entre personas. Desde el Capítulo 27 al 29 consideraremos enfermedades cuyos modos de transmisión involucran como vectores de transmisión a animales, artrópodos o que vienen de fuentes como el suelo, el agua o la comida.

La división de los patógenos de acuerdo a las vías de transmisión y la enfermedad que provocan, harán que en el mismo grupo aparezcan organismos muy diversos. Por ejemplo, la gripe y la faringitis estreptocócica, que discutiremos conjuntamente, se extienden en el contacto persona-persona a través de la vía respiratoria. Producen síntomas que se solapan a pesar de que los agentes causales, uno es un virus y el otro una bacteria, son marcadamente diferentes. Usando esta aproximación esperamos realizar conexiones entre agentes patógenos biológicamente muy diferentes, pero ecológica o patológicamente muy relacionados.

I TRANSMISIÓN DE ENFERMEDADES POR EL AIRE

Los aerosoles, como los generados por el estornudo que aparece en la Figura 26.1, son importantes formas de transmisión persona a persona de muchas enfermedades infecciosas. La mayoría de las enfermedades respiratorias se transmiten casi exclusivamente por este sistema. Por ejem-

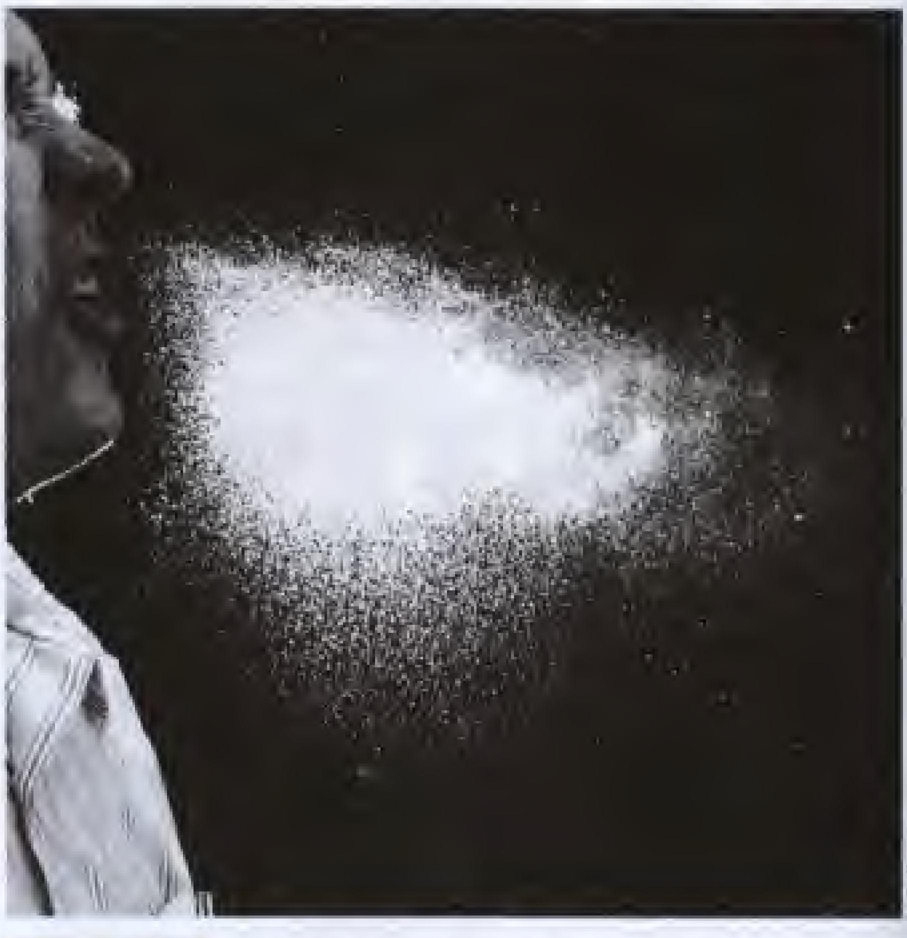

T. D. Brock

Figura 26.1 Fotografía de alta velocidad de un estornudo.

plo, *Mycobacterium tuberculosis* emplea con éxito esta estrategia para infectar, al menos, un tercio de la población mundial (Sección 25.1). El virus de la gripe y de los resfriados utilizan con, incluso mayor éxito esta forma de propagación, y prácticamente todos los individuos padecemos varios resfriados o gripe cada año.

26.1 Transmisión de patógenos por el aire

El aire no es un medio apropiado para el crecimiento de los microorganismos; los organismos que se encuentran en el aire provienen del suelo, agua, plantas, animales, personas u otras fuentes. En el aire del exterior de los edificios predominan los microorganismos que provienen del suelo, mientras que en el aire de los edificios, el número de los microorganismos es considerablemente superior, predominando los que provienen del tracto respiratorio humano.

El polvo arrastrado por el viento transporta un considerable número de microorganismos que pueden ser arrastrados a largas distancias. La mayoría de estos microorganismos sobreviven mal en el aire, por ello su transmisión efectiva a otro humano ocurre sólo a cortas distancias. Sin embargo, ciertos patógenos humanos (*Staphylococcus, Streptococcus*) son capaces de sobrevivir incluso en condiciones de deshidratación, manteniéndose vivos en el polvo durante largos periodos de tiempo. Las bacterias Gram positivas son en general más resistentes a la deshidratación que las Gram negativas, debido a su pared celular más delgada y rígida. Las esporas bacterianas son extremadamente resistentes a la deshidratación, pero generalmente no se transmiten de persona a persona de esta forma.

Enormes cantidades de pequeñas gotas de líquido son extendidas durante un estornudo (Figura 26.1) y un número considerable son extendidas mientras hablamos o tosemos. Cada pequeña gota infecciosa tiene un tamaño de alrededor de 10 μm conteniendo una o dos bacterias. La velocidad de estas gotas es de alrededor de 100 m/seg (más de 300 km/h) en un estornudo y de entre 16-48 m/seg cuando tosemos o hablamos. El número de bacterias en un único estornudo varía desde 10 000 hasta 100 000. Debido al pequeño tamaño de las gotas, éstas se evaporan rápidamente, dejando un núcleo de materia orgánica y moco donde las bacterias se adhieren.

Infecciones respiratorias

Los humanos, a lo largo de nuestra vida, respiramos una media de 500 millones de litros de aire, el cual contiene gran cantidad de microorganismos y por tanto es una potencial fuente de infecciones respiratorias. La velocidad a la que el aire se mueve a lo largo del tracto respiratorio varía, así en la parte inferior de las vías respiratorias la velocidad es mucho más lenta. Cuando la velocidad del aire disminuye, las partículas que transporta se depositan, primero las más grandes y por último las más pequeñas. Solamente las partículas menores a 3 μm son capaces de llegar y depositarse en los bronquiolos, en la zona más baja del tracto respiratorio (Figura 26.2). Diferentes microorganismos, según lo expuesto anteriormente, son capaces de llegar a diferentes niveles dentro del tracto respiratorio, produciendo los diferentes tipos de infecciones que ocurren en el tracto respiratorio superior e inferior.

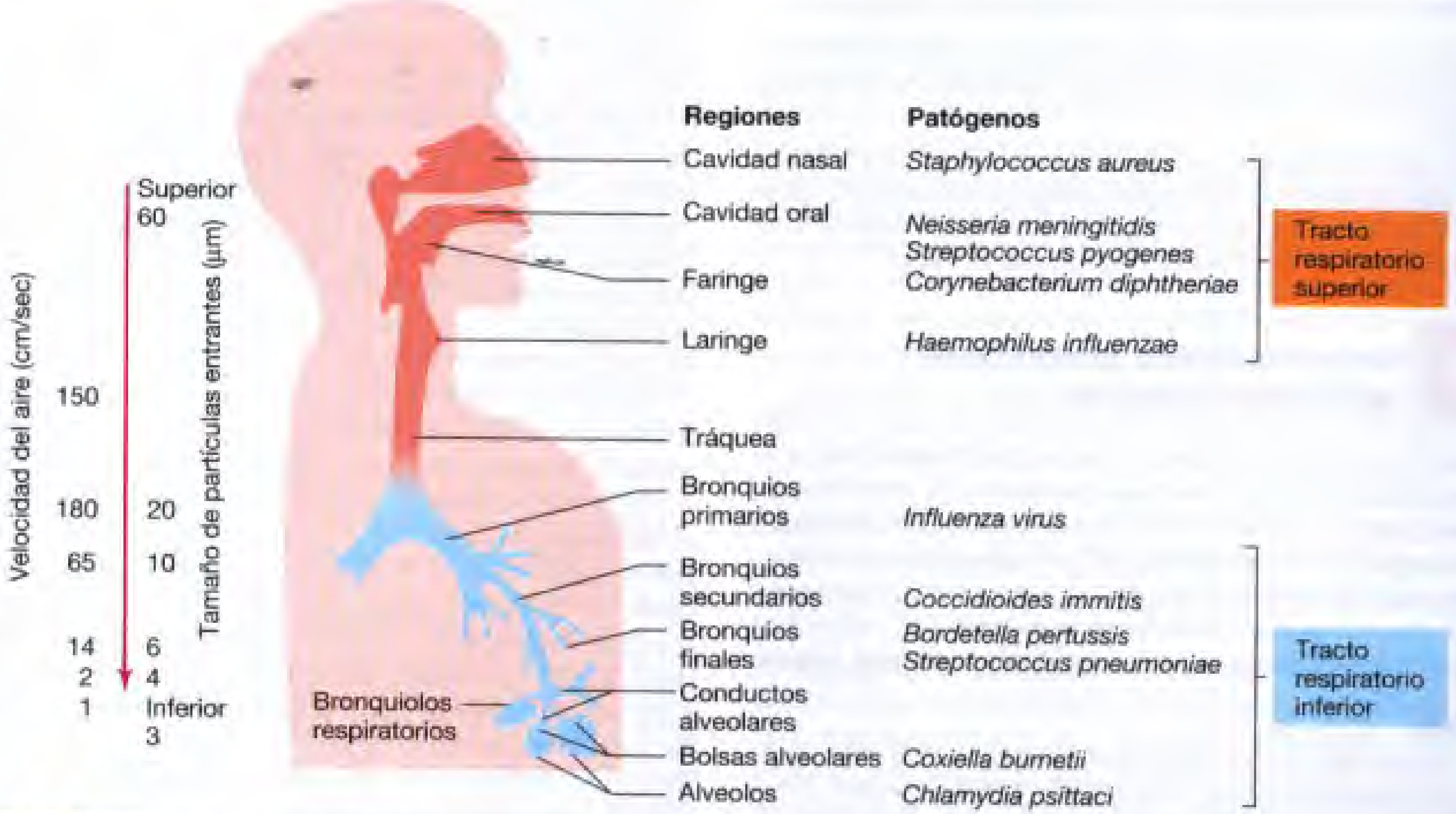

Velocidad del aire (cm/sec)
150
180
65
14
2
1
Superior
60
20
10
6
4
Inferior
3
Tamaño de partículas entrantes (µm)
Regiones
Patógenos
Cavidad nasal
Staphylococcus aureus
Cavidad oral
Neisseria meningitidis
Streptococcus pyogenes
Corynebacterium diphtheriae
Faringe
Laringe
Haemophilus influenzae
Tracto respiratorio superior
Tráquea
Bronquios primarios
Influenza virus
Bronquios secundarios
Coccidioides immitis
Bronquios finales
Bordetella pertussis
Streptococcus pneumoniae
Bronquiolos respiratorios
Conductos alveolares
Bolsas alveolares
Coxiella burnetii
Alveolos
Chlamydia psittaci
Tracto respiratorio inferior

Figura 26.2 El sistema respiratorio del hombre y las distintas localizaciones que los microorganismos patógenos seleccionan para iniciar las infecciones que determinan.

Bacterias patógenas del aparato respiratorio

Existe una amplia variedad de bacterias que afectan al tracto respiratorio, la mayoría se hospeda únicamente en humanos, por tanto su modo de transmisión es de persona a persona. Sólo algunos de ellos como *Legionella pneumophila* se pueden encontrar en el agua o en el suelo; pero ya que comparten fuentes comunes con otros patógenos, serán abordados más adelante. Como ya hemos mencionado, la mayoría de los patógenos respiratorios que se transmiten de persona a persona son bacterias Gram positivas dada su capacidad para vivir en condiciones de deshidratación durante largos periodos de tiempo en virtud de su delgada pared Gram positiva. Las infecciones respiratorias causadas por bacterias, aunque serias por sí mismas, a menudo son iniciadoras de infecciones secundarias que pueden comprometer la vida del individuo. Así pues es crítico el rápido diagnóstico y tratamiento de estas infecciones bacterianas para limitar el daño en el hospedador. Por fortuna, la mayoría de las bacterias que se transmiten por vía respiratoria son sensibles al tratamiento con antibióticos y, además, muchas de ellas también pueden ser controladas por inmunización. Sin embargo, las infecciones respiratorias bacterianas son todavía muy comunes y aquí consideraremos los patógenos respiratorios más comunes. Después examinaremos los patógenos respiratorios víricos y aquellas enfermedades que producen, mucho más difíciles de tratar y prevenir.

✓ 26.1 Revisión de conceptos

Muchos patógenos que se transmiten por vía respiratoria son bacterias Gram positivas. Debido a que las bacterias Gram positivas son muy resistentes a la desecación, se transmiten muy fácilmente por el aire. Otros patógenos menos resistentes se transmiten de persona a persona sólo a través de los aerosoles generados en los estornudos, la tos, al hablar o al respirar.

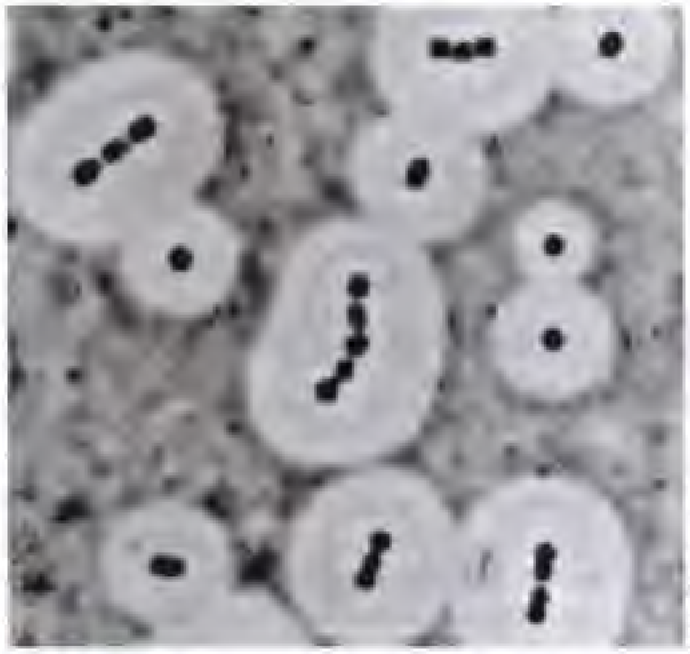
- ✓ ¿Qué características físicas permiten que las bacterias Gram positivas sobrevivan durante largos periodos de tiempo en el aire?
- ✓ ¿Por qué hay determinados patógenos que se encuentran más frecuentemente en el tracto respiratorio superior? ¿Por qué hay determinados patógenos que se encuentran más frecuentemente en el tracto respiratorio inferior?

26.2 Enfermedades producidas por *streptococcus*

Streptococcus pyogenes y *Streptococcus pneumoniae* son potentes patógenos respiratorios humanos. *S. pyogenes* se transmite por vía respiratoria. *S. pneumoniae* se encuentra en la biota respiratoria de más del 40% de las personas sanas; esta cepa endógena puede producir severas enfermedades respiratorias cuando el sistema inmunitario del individuo se encuentra debilitado o comprometido de alguna forma.

Biología

Los *Streptococcus* son cocos Gram negativos, no esporulados, homofermentativos, anaerobios aerotolerantes (Sección 12.19). *Streptococcus pyogenes* crece generalmente en forma de cadenas (Figura 12.54). Cepas patógenas de *Streptococcus pneumoniae* crecen generalmente en parejas o cadenas cortas de células y disponen una de gruesa cápsula de polisacáridos (Figura 26.3)



Isaac Shechmeister

Figura 26.3 Preparación de células de *Streptococcus pneumoniae* en una tinción negativa con tinta china. Nótese la gruesa cápsula que rodea a las células.

Streptococcus pyogenes: epidemiología y patogénesis

Streptococcus pyogenes se aísla frecuentemente del tracto respiratorio superior de personas adultas sanas. Aunque el número de *S. pyogenes* en dicha localización es muy reducido, si el hospedador presenta un sistema inmunitario debilitado, o si es infectado por una nueva y muy virulenta cepa de este microorganismo, puede desarrollar infecciones debidas a la presencia de este microorganismo. *S. pyogenes* es el causante de la faringitis streptocócica (la faringe es el tubo que conecta la cavidad oral con la laringe y el esófago) (Figura 26.2). La mayor parte de los aislados clínicos de pacientes con faringitis streptocócica, producen una toxina capaz de lisar a los glóbulos rojos o, lo que es lo mismo, produce *β-hemólisis* (Figura 21.17). La faringitis streptocócica se caracteriza por un fuerte dolor de garganta, inflamación de las amígdalas, secreciones en las amígdalas, ablandamiento de los nódulos linfáticos cervicales, fiebre pero no muy elevada y malestar general (similar a la amigdalitis). *S. pyogenes* también puede producir infecciones en el oído interno (otitis), en las glándulas mamarias (mastitis) y en las capas superficiales de la piel, enfermedad normalmente conocida como impétigo (muchos casos de esta enfermedad son producidos por *Staphylococcus aureus*) (Figura 26.4).

Aproximadamente la mitad de los casos de dolor severo de garganta se deben a *Streptococcus pyogenes* y el resto a infecciones víricas. El diagnóstico rápido es muy importante, ya que si el origen es vírico, el tratamiento con agentes quimioterapéuticos antibacterianos («antibióticos») no dará resultado alguno, mientras que si el responsable es *S. pyogenes* se requiere una terapia antibacteriana inmediata. Es muy importante el rápido y completo tratamiento de la faringitis streptocócica, porque ocasionalmente puede dar lugar a otros síndromes streptocócicos tales como la fiebre escarlata, fiebre reumática, glomerulonefritis aguda y síndrome de shock tóxico (*véase* más adelante).

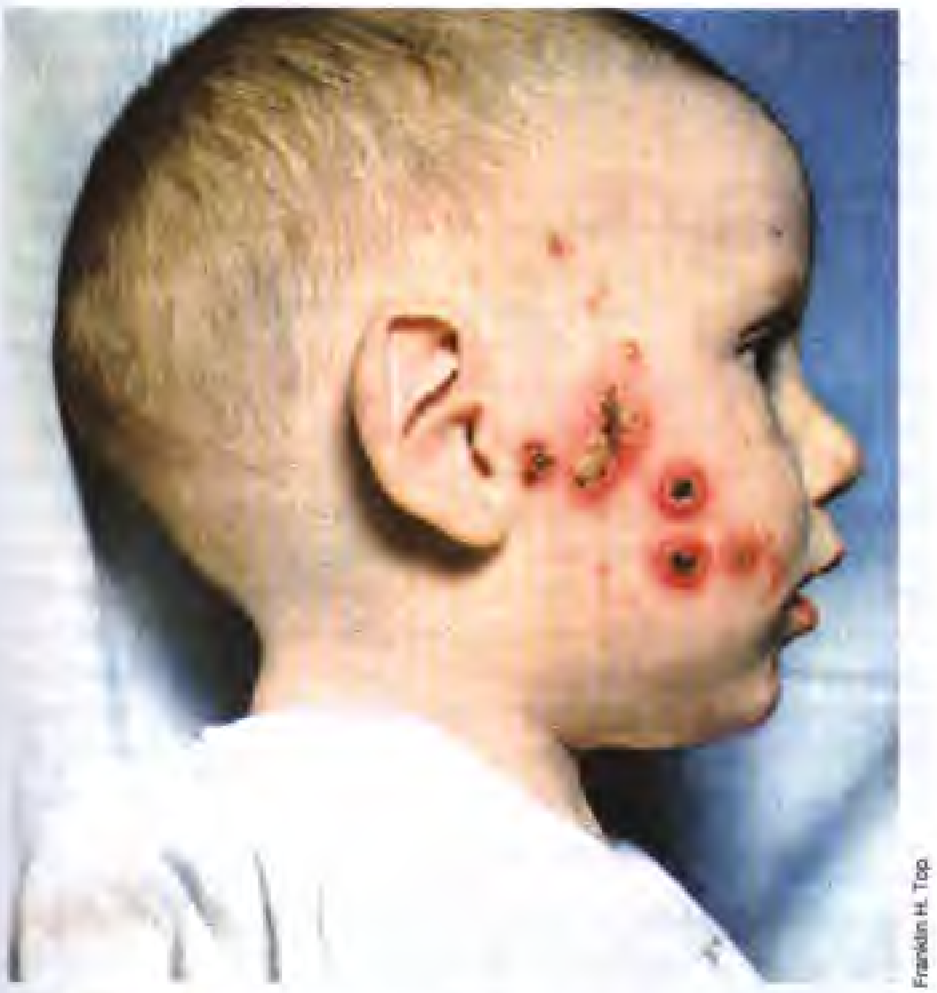


Figura 26.4 Lesiones típicas del impétigo, causado generalmente por *Streptococcus pyogenes* o *Staphylococcus aureus.*

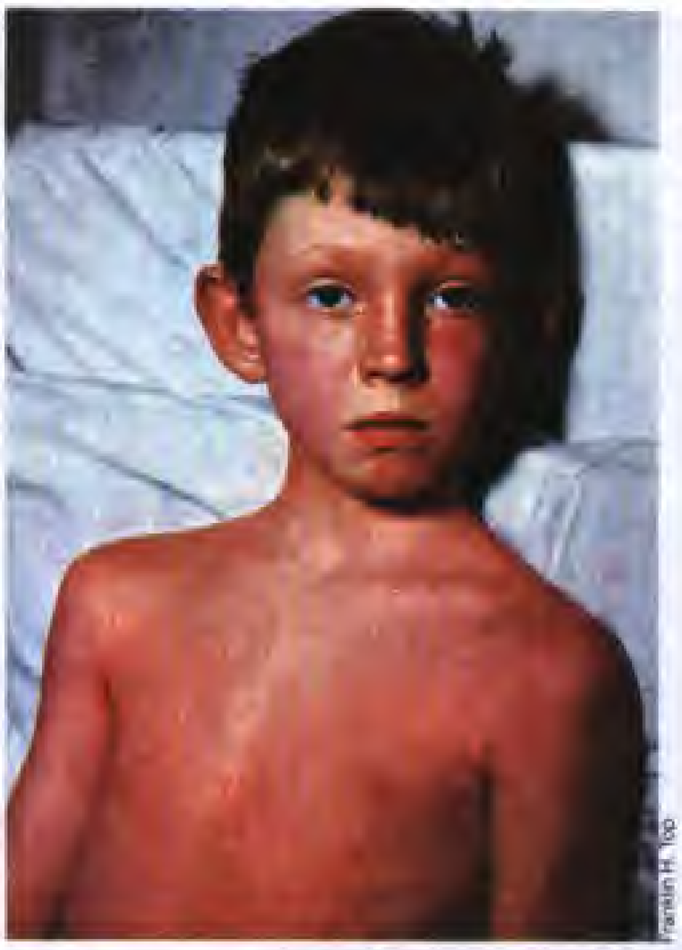


Figura 26.5 Típica erupción de la escarlatina, resultado de la acción de la toxina eritrogénica producida por *Streptococcus pyogenes.*

Ciertas cepas de *Streptococcus pyogenes* poseen un bacteriófago lisogénico que codifica la producción de una toxina eritrogénica, exotoxina responsable de la mayoría de los síntomas de la fiebre escarlata. La toxina eritrogénica produce un sarpullido rosa-rojizo (Figura 26.5), daña los capilares sanguíneos produciendo fiebre. La enfermedad es fácilmente controlada mediante el uso de agentes antibacterianos.

Ocasionalmente, *Streptococcus pyogenes* puede producir infecciones sistémicas fulminantes, a menudo marcadas por fascitis necronizante, una rápida y progresiva infección de los tejidos subcutáneos. Estas infecciones son responsables del dramático, pero afortunadamente raro, caso de «bacterias comedoras de carne». En estos casos las exotoxina A y B, y la proteína de superficie M actúan como superantígenos (Sección 22.14) que atraen a una cantidad masiva de linfocitos T a los tejidos infectados. Las células T secretan citoquinas que activan a una gran cantidad de células efectoras, dando lugar a una inflamación masiva sistémica, destrucción de tejidos y muerte en mas del 30% de los casos.

Las infecciones por *Streptococcus pyogenes* no tratadas o insuficientemente tratadas pueden dar lugar a secuelas severas o a enfermedades recurrentes. La fiebre reumática, una de estas secuelas, es causada por cepas reumatogénicas de *Streptococcus pyogenes* que disponen de antígenos de superficie similares a algunos antígenos de superficie humanos. La respuesta inmunitaria frente a los organismos invasores produce anticuerpos que presentan reactividad cruzada con los tejidos del hospedador, en particular a corazón, articulaciones y riñón, desencadenando la destrucción de estos tejidos. La fiebre reumática es un tipo de enfermedad autoinmune, con anticuerpos reaccionando frente a componentes propios (Sección 22.13). El daño puede ser permanente y es frecuentemente incrementado por posteriores infecciones estreptocócicas y subsecuentes brotes de fiebre reumática.

Otra secuela potencial de la infección por *Streptococcus pyogenes* es la gromerulonefritis aguda, una enfermedad muy dolorosa de los riñones. Es una compleja enfermedad autoinmune (Sección 22.13) que resulta de la formación de complejos anticuerpo-antígeno streptocócico en el torrente sanguíneo. Los complejos inmunitarios se acumulan en los glomérulos o en las membranas de filtración del riñón, causando la inflamación del mismo (nefritis) acompañada por daño severo de este órgano. En pocos días estos complejos se disuelven y el paciente rápidamente vuelve a la normalidad. Desafortunadamente, incluso el oportuno tratamiento con agentes antibacterianos no previene la glomerulonefritis. Sin embargo, sólo unas pocas cepas de *S. pyogenes* —las llamadas nefritogénicas— producen esta dolorosa enfermedad.

Por fortuna la reinfección por una cepa concreta de *Streptococcus pyogenes* es rara, pero existen más de 60 cepas antigénicamente distintas definidas por los antígenos de superficie y por la proteína de superficie M. Así pues, un individuo puede infectarse más de 60 veces por diferentes cepas de *S. pyogenes*. En la actualidad no se dispone de vacunas para prevenir la infección por *Streptococcus pyogenes.*

Diagnóstico: *Streptococcus pyogenes*

Debido a la gravedad de los daños que pueden derivarse de la faringitis streptocócica, se han desarrollado varios sistemas de detección rápida (RAD) de *S. pyogenes*. Los antígenos de superficie son extraídos enzimática o químicamente a partir de un frotis de la garganta del paciente. Se emplean métodos inmunológicos como aglutinación en bolas de látex, inmunoensayos del tipo ELISA o tinción con anticuerpos fluorescentes específicos frente a las proteínas de superficie exclusivas de *Streptococcus pyogenes* (Secciones 24.8, 24.11 y 24.10). Con ello, las muestras se toman directamente con el frotis de la garganta, y son analizadas y procesadas en pocos minutos. El rápido diagnóstico permite a los médicos la inmediata imposición de un tratamiento apropiado que evite posteriores complicaciones como la fiebre reumática. Sin embargo una mejor confirmación de la infección por estreptococos patógenos es el cultivo de *Streptococcus pyogenes* a partir de la garganta. En general, los tests RAD son casi tan específicos como el cultivo, pero un 40% menos sensibles y dando lugar, además, a algunos falsos positivos (Sección 24.5). Los cultivos a partir de la muestra de garganta pueden tardar hasta dos días, por ello la popularidad que han adquirido los tests RAD. Por último, la prueba más fiable y sensible para identificar infecciones estreptocócicas recientes son los tests serológicos, mediante los cuales se detecta la presencia o el incremento (el título) de anticuerpos frente a diversos antígenos estreptocócicos (Sección 24.5). La presencia de nuevos anticuerpos o el incremento en la cantidad de uno existente confirma la infección reciente.

Streptococcus pneumoniae

La otra gran especie patógena de estreptococos, *Streptococcus pneumoniae*, produce infecciones pulmonares que a menudo, como infecciones secundarias, dan lugar a otros desórdenes respiratorios. La cápsula de esta bacteria le permite eludir la fagocitosis; en consecuencia, las cepas encapsuladas de este microorganismo son muy invasivas. Las células bacterianas ocupan los alvéolos pulmonares (tracto respiratorio inferior) induciendo una fuerte respuesta inflamatoria en el hospedador. La acumulación de fluidos y células fagocíticas en los alvéolos determina una disminución en la funcionalidad de los pulmones, además, *S. pneumoniae* puede extenderse desde el foco de la infección dando lugar a una bacteriemia, infectando tejidos como los huesos, oído interno y el endocardio. La neumonía causada por *S. neumoniae* es una infección seria que, cuando no es tratada convenientemente, produce un 30% de casos de mortalidad. Incluso con un intenso y agresivo tratamiento antibacteriano, este organismo causa un 5-10% de mortalidad en los individuos hospitalizados.

La diagnosis de *S. pneumoniae* se realiza mediante el cultivo y la localización de diplococos Gram positivos típicos a partir de esputo o sangre de los pacientes. Existen 90 diferentes serotipos o variantes antigénicas de la cápsula y la infección produce inmunidad exclusivamente frente a la cepa de *S. pneumoniae* que determina la infección.

Prevención y tratamiento

No existen vacunas efectivas para la prevención de las infecciones por *Streptococcus pyogenes*. Sin embargo, sí se dispone de una vacuna multivalente que previene la infección de, al menos, dos tercios de las 90 cepas conocidas de *S. pneumoniae*, incluyendo todas las cepas patógenas conocidas. La vacuna consiste en una mezcla de los polisacáridos capsulares de las cepas patógenas más relevantes. Se recomienda la vacunación a personas mayores, personal sanitario, individuos inmunodeprimidos y otros con alto riesgo de infecciones respiratorias (Sección 22.11).

La penicilina y sus derivados semisintéticos (Sección 20.8) son los agentes de elección en el tratamiento de las infecciones por *S. pyogenes*. Los individuos que presentan alergia a los anteriores antibióticos son tratados con eritromicina y otros agentes antibacterianos (Sección 22.13)

La mayoría de las cepas de *S. pneumoniae* son sensibles a la terapia con penicilinas. Sin embargo, existen cepas resistentes a la penicilina, especialmente entre las cepas que producen las infecciones hospitalarias (Sección 25.7), y por ello en los aislados individuales debe ser comprobada la sensibilidad a la penicilina (Sección 24.3). La eritromicina es el tratamiento adecuado en las infecciones resistentes a la penicilina, aunque también pueden emplearse cefalosporina, fluoroquinolona, ceftriaxona, cefotaxima o vancomicina (*véanse* Secciones 20.6-20.9). No obstante, se han encontrado cepas resistentes a estas sustancias e incluso multirresistentes, lo que enfatiza la necesidad de realizar pruebas de resistencia de forma individual a cada uno de los aislados.

✓ 26.2 Revisión de conceptos

Las dos enfermedades respiratorias causadas por los estreptococos son: la faringitis estreptocócica y la neumonía producida por los neumococos. Bajo determinadas condiciones una simple infección por *Streptococcus pyogenes* puede dar lugar a importantes enfermedades como la fiebre escarlata o la fiebre reumática. La neumonía causada por *Streptococcus pneumoniae* es siempre una enfermedad grave.

- ✓ ¿Cómo una infección por *Streptococcus pyogenes* puede causar fiebre reumática?
- ✓ ¿Cuál es el principal factor de virulencia de *Streptococcus pneumoniae*?

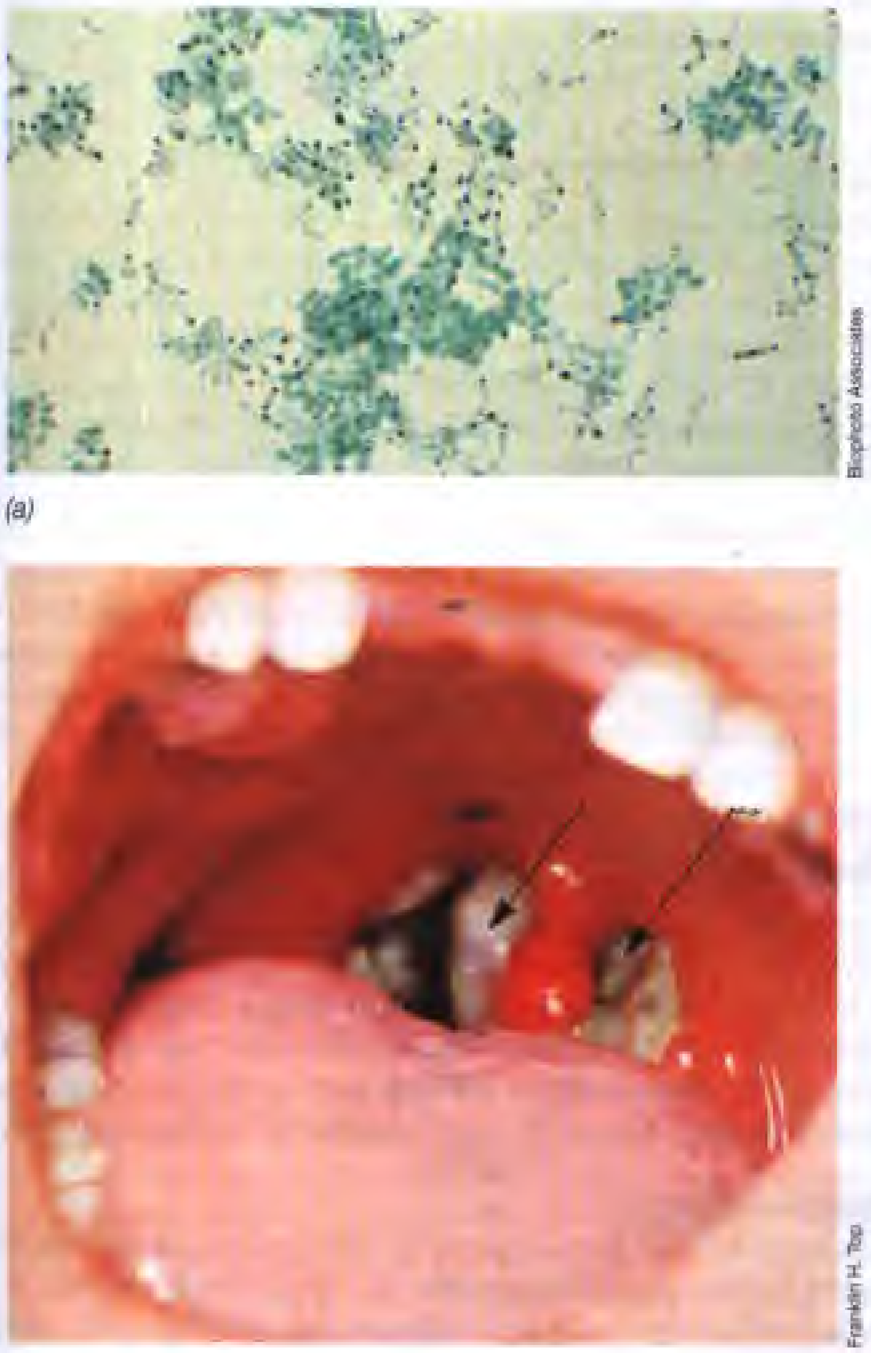
26.3 Corynebacterium y difteria

Corynebacterium diphtheriae es el organismo causante de la difteria, una severa enfermedad respiratoria que afecta fundamentalmente a los niños. La difteria se puede prevenir y tratar. *C. diphtheriae* es una bacteria aeróbica, Gram positiva, inmóvil con forma de varilla o de porra (Sección 12.22).

Epidemiología y patología

Corynebacterium diphtheriae entra en el cuerpo a través de la vía respiratoria albergándose en las células de la garganta y de las amígdalas. La infección se transmite de individuos sanos portadores o individuos infectados a individuos susceptibles a través del aire. La infección previa o la inmunización (*véase* más adelante) determina la completa resistencia a la enfermedad. Aunque se dispone de limitada información sobre los mecanismos de adherencia de *C. diphtheriae* a los anteriores tejidos, sí se sabe que organismos que producen neuraminidasa capaz de producir ácido *N*-acetilneuramínico (un componete de las glicoproteínas que se encuentran en las superficies mucosas), el cual es capaz de favorecer el proceso invasivo. La respuesta inflamatoria de los tejidos de la garganta frente a la infección por *C. diphtheriae* produce la formación de una lesión característica llamada *pseudomembrana* (Figura 26.6), consistente en células del hospedador dañadas y células de *C. diphtheriae*. Como se describe en la Sección 21.9, ciertas cepas de *C. diphtheriae* llevan integrado el material genético del bacteriófago β; estas cepas producen una fuerte exotoxina, *la toxina diftérica*. La toxina diftérica inhibe la síntesis proteica y por tanto mata las células del hospedador (*véase* Sección 21.10).

La pseudomembrana que forma la difteria puede bloquear el paso del aire determinando que la muerte producida por esta enfermedad sea consecuencia de una mezcla entre la destrucción de los tejidos causada por la toxina y la deficiente respiración causada por la pseudomembrana. Aunque en tiempos pasados la difteria fue una de las más importantes enfermedades infantiles, en la actualidad aparece muy raramente debido a la disponibilidad de una eficaz vacuna. En todo el mundo hay todavía más 50 000 casos de difteria por año, principalmente por la ausencia de inmunización. Recientres brotes en el sureste asiático y en el este de Europa han sido atribuidos a la ausencia de programas de vacunación o a la interrupción de los programas existentes respectivamente.


(a)

Biophoto Associates

(b)

Franklin H. Top

Figura 26.6 Difteria. (a) Células de *Corynebacterium diphtheriae* teñidas para visualizar los gránulos metacromáticos (polifosfatos). (b) Pseudomembrana (flechas) en un caso de difteria causada por *C. diphtheriae*.

Diagnóstico, prevención y tratamiento

La destrucción del tejido debido a la absorción de la toxina causa la aparición de la pseudomembrana en la garganta del paciente. La prueba diagnóstica de la difteria es el aislamiento de *C. diphtheriae* de la garganta de un individuo. La toxina, en ausencia de tratamiento, puede producir daño sistémico en órganos como corazón, riñones, hígado y glándulas adrenales.

Un paciente diagnosticado con difteria es tratado simultáneamente con antibióticos y con una antitoxina diftérica (una antitoxina contiene anticuerpos neutralizadores producidos en otro animal) (*véanse* Secciones 24.7 y 22.11 sobre antitoxinas). Penicilina, eritromicina o gentamicina son empleadas como terapia efectiva frente a esta enfermedad. La temprana administración de estos antibióticos y de la antitoxina son esenciales para una efectiva prevención de la enfermedad.

La prevención de la difteria se aborda gracias al uso de una muy efectiva vacuna. La vacuna se hace tratando la exotoxina diftérica con formalina para producir una inmunogénica, no tóxica, sino toxoide. El toxoide de la difteria forma parte de la vacuna DTP (difteria, tétanos, pertusis) (*véase* Sección 22.11).

✓ 26.3 Revisión de conceptos

La difteria es causada por la bacteria Gram positiva *Corynebacterium diphtheriae*. Existe una vacuna estandarizada que se administra a los niños en edad temprana (DTP) muy efectiva en la prevención de esta seria afección respiratoria.

✓ ¿La patogénesis de la difteria es debida a la infección?

✓ ¿Cómo se puede prevenir la dispersión de la difteria?

26.4 *Bordetella* y tosferina

La tosferina es una enfermedad respiratoria potencialmente grave causada por *Bordetella pertussis*. *B. pertussis* es un pequeño cocobacilo, aeróbico y Gram negativo.

Epidemiología y patogenia

La tosferina (pertusis) es una enfermedad respiratoria aguda muy infecciosa que se observa a menudo en individuos de menos de 25 años. *Bordetella pertussis* se adhiere a las células del tracto respiratorio superior gracias a la producción de un factor específico de adherencia llamado *antígeno filamentoso hemaglutinante* que reconoce un receptor complementario en la superficie de las células del hospedador. Una vez unida, *B. pertussis* se multiplica y produce la exotoxina pertussis que induce la síntesis de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) (*véase* Sección 8.7), la cual es parcialmente responsable de los fenómenos que dan lugar al daño en los tejidos. *Bordetella pertussis* también produce una endotoxina que también puede inducir alguno de los síntomas de la tosferina. Clínicamente, la tosferina se caracteriza por una recurrente tos violenta que puede durar hasta 6 semanas. El nombre de esta enfermedad le viene dado precisamente por esa tos espasmódica y los sonidos producidos por el paciente al tratar de respirar profundamente para obtener aire suficiente.

Diagnóstico

El diagnóstico de la tosferina se puede realizar mediante la tinción con anticuerpos fluorescentes de muestras de la garganta del paciente o mediante el cultivo del microorganismo. El mejor método de recuperación y crecimiento de este microorganismo desde un paciente consiste en la inoculación de un aspirado nasofaríngeo directamente en una placa de agar con extracto de patata glicerol y sangre (aunque no es selectivo, este medio permite una buena recuperación de *B. pertussis*). Colonias β-hemolíticas formadas por pequeños cocobacilos Gram negativos son testadas para *B. pertussis* mediante una prueba de aglutinación de bolitas de vidrio o mediante tinción con anticuerpos fluorescentes frente a *B. pertussis* (*véanse* Secciones 24.8 y 24.10).

Prevención y tratamiento

Rutinariamente se administra una vacuna, como parte de la DTP, consistente en células muertas completas o proteínas derivadas de *Bordetella pertussis*. Esta vacuna, aunque normalmente muy efectiva, debe ser administrada a individuos susceptibles, habitualmente niños, en intervalos apropiados comenzando inmediatamente después del nacimiento (*véase* Sección 22.11). En los Estados Unidos, más del 50% de los niños que adquieren la tosferina no han sido correctamente inmunizados y las preparaciones actuales son efectivas sólo entre un 60 y un 90%. La incidencia de esta muy infecciosa enfermedad permanece elevada, como demuestran los brotes epidémicos en diferentes ciudades de los Estados Unidos y de la antigua Unión Soviética, presumiblemente por el mal seguimiento de los programas de salud pública. En los últimos años ha habido un alarmante aumento en los casos de pertusis en los Estados Unidos (Figura 26.7) y más del 60% de los más de 4000 casos por año son individuos de más de 5 años, incluyéndose adolescentes y adultos.

Debido a los efectos secundarios de la vacuna, incluyendo hinchazón y enrojecimiento local, fiebre y ocasionalmente problemas más serios como encefalitis y convulsiones, una «segunda generación» de vacunas, que contienen fracciones celulares purificadas de *Bordetella pertussis* y no células completas, ha sido recientemente aprobada para su administración en los Estados Unidos (*véase* Sección 22.11).

Los cultivos de *B. pertussis* son destruidos por ampicilina, tetraciclina y eritromicina aunque, *in vivo*, los antibióticos solos no son capaces de controlar la infección. La respuesta inmunitaria del individuo frente a la infección por *Bordetella pertussis* debe ser tan importante o más que la administración de los antibióticos, ya que los individuos que padecen esta enfermedad son capaces de transmitir la enfermedad incluso hasta 2 semanas después del comienzo de la terapia con antibióticos.

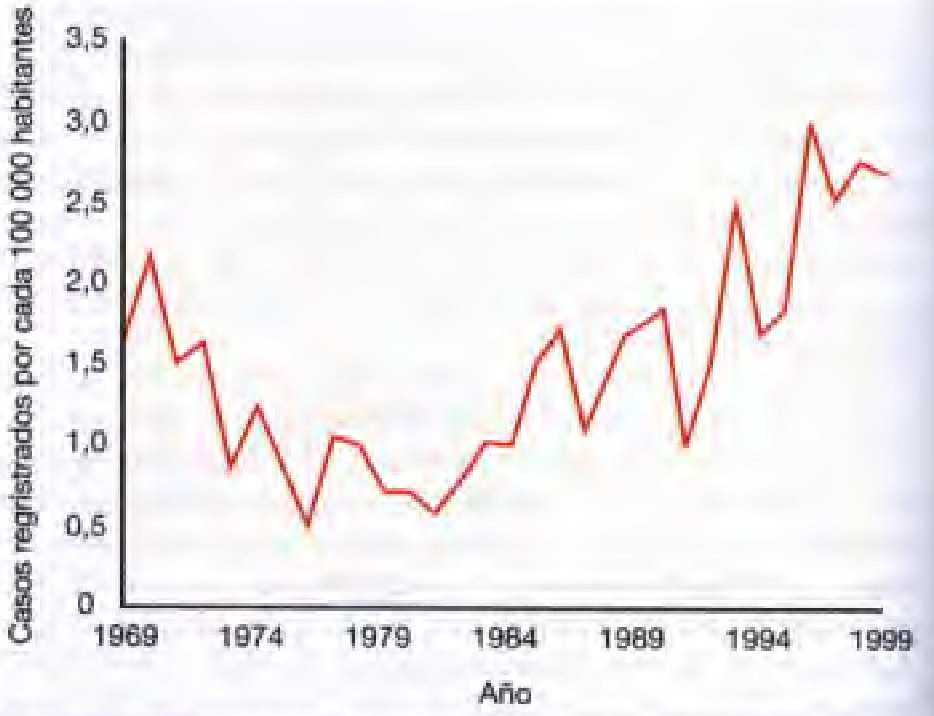


Figura 26.7 Incidencia de la tosferina en los Estados Unidos. A partir de los años 80 se observa un continuo incremento en el número de caos. En 1999 se contabilizaron 7288 casos de tosferina en los Estados Unidos. En 1976, el año con menor número de casos, hubo únicamente 1010 casos.

✓ 26.4 Revisión de conceptos

En los Estados Unidos ha existido un inquietante incremento de los casos de tosferina en la última década. Entre 1975 y 1982 hubo de media menos de 2000 casos por año, pero la incidencia ha aumentado actualmente hasta más de 7000 casos por año. Más del 60% de los niños preescolares son inadecuadamente inmunizados en algunas ciudades, dado lugar a un potencial problema de salud pública.

- ✓ ¿Qué medidas pueden ser tomadas para reducir el actual incremento en la incidencia de tosferina en la población?
- ✓ Indique problemas potenciales derivados del uso de vacunas con células completas de tosferina. Indique los pasos tomados para reducir los citados problemas en las nuevas vacunas

26.5 *Mycobacterium* y tuberculosis

La tuberculosis es producida por el bacilo Gram positivo, ácido-alcohol resistente *Mycobacterium tuberculosis* (*véase* Sección 12.23). Fue aislado, descrito y responsabilizado de la tuberculosis en 1882 por el famoso microbiólogo alemán Robert Koch (*véase* Sección 1.5 y el recuadro «Descubridores de los principales patógenos bacterianos», en ese capítulo).

Epidemiología

Los bacilos de la tuberculosis de *Mycobacterium tuberculosis* se transmiten muy fácilmente a través de la vía respiratoria; incluso el simple acto de hablar es suficiente para la transmisión de persona a persona. En un tiempo, la tuberculosis fue la enfermedad infecciosa más relevante dando cuenta de una de cada siete muertes de seres humanos en todo el mundo. Actualmente, en los Estados Unidos, cerca de 20 000 casos de tuberculosis son diagnosticados cada año. En todo

Aprendiendo del pasado... Descubridores de los principales patógenos bacterianos

La historia de los descubrimientos de la importancia de los microorganismos en las enfermedades infecciosas ha sido detallado en el Capítulo 1 (*véase* Sección 1.5). Una vez fue aceptado el concepto de microorganismos como agentes productores de enfermedades y desarrollados los procedimientos para el cultivo de los microorganismos en el laboratorio, se facilitó el camino para el descubrimiento y aislamiento de un gran número de microorganismos patógenos. Las décadas en torno a la formulación de los postulados de Koch (1884) fueron muy fructíferas para la microbiología médica. El rápido desarrollo de este campo se detalla en la siguiente tabla, en la cual se recogen los principales patógenos aislados durante la «edad de oro de la bacteriología». ■

Año	Enfermedad	Organismo	Descrubridor
1873	Lepra	*Mycobacterium leprae*	Hansen, G. A.
1877	Carbunco	*Bacillus anthracis*	Koch, R.
1878	Infección purulenta	*Staphylococcus*	Koch, R.
1879	Gonorrea	*Neisseria gonorrhoeae*	Neisser, A. L. S.
1880	Fiebre tifoidea	*Salmonella typhi*	Eberth, C. J.
1881	Infección purulenta	*Streptococcus*	Ogston, A.
1882	Tuberculosis	*Mycobacterium tuberculosis*	Koch, R.
1883	Cólera	*Vibrio cholerae*	Koch, R.
1883	Difteria	*Corynebacterium diphtheriae*	Klebs, T. A. E.
1884	Tétanos	*Clostridium tetani*	Nicolaier, A.
1885	Diarrea	*Escherichia coli*	Escherich, T.
1886	Neumonía	*Streptococcus pneumoniae*	Fraenkel, A.
1887	Meningitis	*Neisseria meningitidis*	Weichselbaum, A.
1888	Intoxicación alimentaria	*Salmonella enteritidis*	Gaertner, A. A. H.
1892	Gangrena	*Clostridium perfringens*	Welch, W. H.
1894	Peste	*Yersinia pestis*	Kitasato, S., Yersin, A. J. E. (independently)
1896	Botulismo	*Clostridium botulinum*	van Ermengem, E. M. P.
1898	Disentería	*Shigella dysenteriae*	Shiga, K.
1900	Fiebres paratifoideas (paratíficas)	*Salmonella paratyphi*	Schottmüller, H.
1903	Sífilis	*Treponema pallidum*	Schaudinn, F. R., and Hoffman, E.
1906	Tosferina	*Bordetella pertussis*	Bordet, J., and Gengou, O.

el mundo, la tuberculosis es responsable de 1,5 millones de muertes al año, más del 10% del total de muertes por enfermedades infecciosas y más de un tercio de la población mundial ha estado infectada por *M. tuberculosis* (*véase* Tabla 25.1). En los últimos años, muchos de los nuevos casos de tuberculosis en los Estados Unidos resultan, al menos en parte, de la elevada incidencia de esta enfermedad en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Sólo en Estados Unidos cada año mueren más de 1000 personas de tuberculosis.

Patogenia

La interacción entre *Mycobacterium tuberculosis* y las células del hospedador es extremadamente compleja, siendo determinada en parte por la virulencia de la cepa, pero también por la resistencia específica y no específica del hospedador. La inmunidad mediada por células juega un importante papel en el desarrollo de los síntomas de la enfermedad. Es conveniente diferenciar entre dos tipos de infecciones tuberculosas humanas: *primaria* y *postprimaria* (o reinfección). La infección primaria es la primera infección que un individuo adquiere como consecuencia de la inhalación de pequeñas gotitas de líquido que contienen bacterias viables y provenientes de un individuo con una infección pulmonar activa. Partículas de polvo que han sido contaminadas por esputos de individuos tuberculosos son otra fuente de infección primaria. La bacteria se ubica en los pulmones donde se multiplica. Una reacción de hipersensibilidad retardada (*véase* Sección 22.13) resulta de la formación de agregados de macrófagos activados, llamados *tubérculos*, característicos de la tuberculosis (*véase* Figura 1.13). No obstante las bacterias, a menudo, son capaces de sobrevivir y multiplicarse en cierta medida en el interior de los macrófagos. En individuos que presentan baja resistencia, las bacterias no son eficientemente controladas y dan lugar a una infección pulmonar aguda, que puede desembocar en una destrucción masiva del tejido pulmonar, el esparcimiento de la bacteria a otras partes del cuerpo y la muerte.

En la mayoría de los casos de tuberculosis, sin embargo, la infección aguda no tiene lugar, permaneciendo localizada y habitualmente sin manifestaciones; posteriormente puede aparecer. Pero esta infección inicial hipersensibiliza al individuo frente a la bacteria o a sus productos y consecuentemente altera la respuesta del individuo ante posteriores exposiciones a *M. tuberculosis*. Un prueba diagnóstica, llamada **test de la tuberculina**, puede ser usada para medir dicha hipersensibilidad. Cuando la *tuberculina*, una fracción proteica obtenida de *Mycobacterium tuberculosis*, es inyectada intradérmicamente (subcutáneamente) en un individuo hipersensible, desarrolla una reacción inmunitaria localizada en un periodo entre 1 y 3 días en el sitio de la inyección. La reacción se caracteriza por una hinchazón (edema) y endurecimiento (*véase* Figura 22.24). A un individuo que muestre esta reacción se le considera *tuberculina positivo*; muchos adultos resultan positivos a esta prueba como resultado de una infección previa no manifestada. Un test positivo de tuberculina no indica que se esté enfermo, únicamente que el individuo ha estado expuesto al microorganismo en el pasado y ha generado una respuesta inmunitaria mediada por células.

Para la mayoría de los individuos, esta inmunidad es protectiva y dura toda la vida. Sin embargo, algunos pacientes tuberculina positivos desarrollan tuberculosis postprimaria debido a una reinfección proveniente de fuentes exógenas o por reactivación de bacterias que han permanecido quiescentes dentro de los macrófagos pulmonares, a menudo durante años. Factores como envejecimiento, malnutrición, estrés, agitación y desórdenes hormonales pueden jugar un importante papel en predisponer a individuos a la reinfección por reducción en la efectividad del sistema inmunitario (*véase* Sección 21.13) permitiendo la reactivación de infecciones latentes.

Las infecciones pulmonares secundarias a menudo progresan hacia infecciones crónicas que tienen como resultado la destrucción de los tejidos de los pulmones, seguido de parcial cicatrización y calcificación en los sitios de la infección. Por tanto la tuberculosis postprimaria crónica frecuentemente resulta en un gradual esparcimiento de las lesiones a lo largo de los pulmones. Las áreas de tejidos destruidos se pueden ver por rayos X (Figura 26.8), las bacterias pueden ser aisladas de los esputos únicamente en pacientes con una extensa destrucción tisular.

Prevención y tratamiento

Los individuos que tienen tuberculosis activa pueden diseminarla a individuos sanos simplemente a través de tosidos o hablando. Debido a que la tuberculosis es muy contagiosa, el organismo responsable de la seguridad y la salud en el trabajo en los Estados Unidos obliga a estrictos requerimientos para la protección de los trabajadores responsables del cuidado de los enfermos con tuberculosis. Por ejemplo, pacientes con tuberculosis han de ser hospitalizados en habitaciones con presión negativa. Además, los trabajadores encargados de sus cuidados deben llevar mascarillas con filtros de aire de alta eficiencia (HEPA). Estos filtros especiales previenen el paso de *Mycobacterium tuberculosis* de esputos o partículas de polvo.

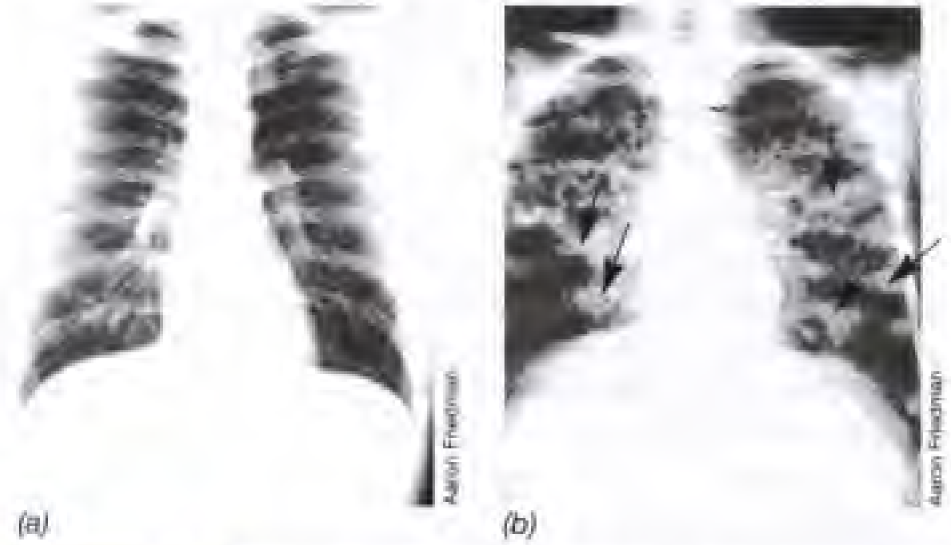


Figura 26.8 Fotografías de rayos X. (a) Radiografía torácica normal. Las líneas blancas poco intensas son arterias y otros vasos sanguíneos. El corazón es visible como un bulto blanco en el cuadrante inferior derecho. (b) Un caso avanzado de tuberculosis pulmonar; los parches blancos (flechas) indican áreas enfermas. Estos parches o tubérculos, pueden contener bacterias de *Mycobacterium tuberculosis* vivas. Los tejidos y la función pulmonar son permanentemente destruidos por estas lesiones.

La terapia con medicamentos ha sido el factor más importante que ha contribuido al control de la tuberculosis. El éxito inicial de esta terapia ocurrió como resultado de la introducción de la estreptomicina, aunque la revolución en el tratamiento de la tuberculosis fue el descubrimiento del ácido isonicotínico hidracida (isoniacida o INH) (Figura 26.9), un derivado de la nicotinamida virtualmente específico frente a las micobacterias. Este compuesto no es sólo efectivo y carente de toxicidad, sino además barato y fácilmente absorbido cuando se administra por vía oral. Aunque el modo de acción de la isoniacida no es completamente conocido, aparentemente interfiere con la síntesis del ácido micólico de las micobacterias (el ácido micólico es un complejo lipídico que se une al peptidogliano de la pared de las micobacterias) (*véase* Sección 12.23). El modo de acción de la isoniacida puede ser la mimetización de la actividad de una molécula estructuralmente relacionada, la nicotinamida (Figura 26.9), incorporándose en lugar de ésta e inactivando las enzimas que requieren nicotinamida para su actividad. El tratamiento de micobacterias con cantidades muy pequeñas de isoniacida (5 picomoles [pmol] por 10^9 células) resulta en la completa inhibición de la síntesis de ácido micólico y la incubación continuada a este agente da lugar a la pérdida de zonas completas de la membrana externa y, por tanto, la pérdida de la permeabilidad selectiva y la muerte de la bacteria. Como consecuencia del tratamiento con isoniacida, las micobacterias pierden la ácido-alcohol resistencia, ya que es el ácido micólico el responsable del fundamento de esta tinción (*véase* Sección 12.23). No obstante, las resistencias a isoniacida y a otras drogas por parte de las micobacterias están creciendo de modo alarmante, especialmente en enfermos con SIDA (*véase* Sección 26.14).

El tratamiento típico incluye dosis diarias de isoniacida y rifampicina durante dos meses, seguido de dosis bisemanales hasta un total de 9 meses, para erradicar el bacilo del tubérculo y prevenir la aparición de cepas resistentes a estos antibióticos. Si no se termina el tratamiento o hay deficiencias en su cumplimiento, pueden aparecer reactivaciones de

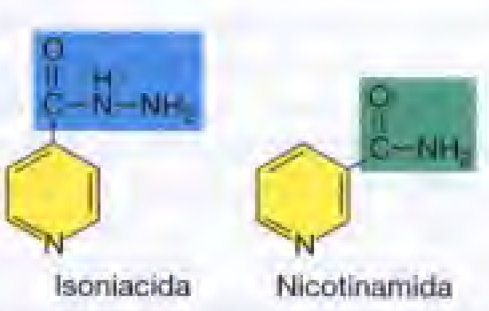


Figura 26.9 Estructura de la isoniacida (ácido isonicotinoico hidracido) un agente quimioterapeútico efectivo frente a la tuberculosis. Nótese el parecido estructural con la nicotinamida.

la enfermedad, en las cuales el microorganismo puede haber adquirido resistencia al anterior tratamiento. El tratamiento inadecuado incentiva la aparición de resistencias ya que tiene lugar un elevado número de mutaciones espontáneas en *M. tuberculosis*, que determinan la resistencia a dichos antibióticos. La terapia adecuada con múltiples medicamentos reduce la probabilidad de emergencia de cepas con resistencia a todos ellos. En ciertas poblaciones, tales como hospitales o clínicas de reposo, los pacientes son tratados rutinariamente con más de cuatro medicamentos y durante al menos 6 meses para descartar la emergencia de tuberculosis resistentes a los medicamentos.

Micobacterium leprae y la enfermedad de Hansen

Mycobacterium leprae es el agente etiológico de la antigua y temida *enfermedad de Hansen* o *lepra*. *M. leprae* es la única especie de *Mycobacterium* que no ha podido crecer en medios de cultivo artificiales. El único animal de experimentación en el que ha podido crecer con éxito y en el que produce una enfermedad parecida es el armadillo. La manifestación más grave de la enfermedad de Hansen se caracteriza por la aparición de pliegues y lesiones en forma de bulbo, especialmente en la cara y extremidades (Figura 26.10) debido al crecimiento de *M. leprae* en la piel. Las lesiones características contienen mas de 10^9 células bacterianas por gramo de tejido. Al igual que *M. tuberculosis*, *M. leprae* se tiñe de rojo intenso con fucsina mediante la tinción de ácido-alcohol resistente, siendo una rápida y definitiva demostración de infección activa (*véase* Sección 12.23). Esta *multibacilar* o *lepromatosa* forma de lepra tiene una muy pobre prognosis. En casos severos, la lesiones producen la desfiguración de las facciones, la destrucción de los nervios periféricos y la pérdida de las funciones motoras. Muchos pacientes muestran lesiones mucho menos severas de las que no se pueden aislar bacterias. Estos pacientes tienen la *tubercular* o *paucibaciar* forma de la enfermedad. La lepra tubercular se caracteriza por una fuerte hipersensibilidad retardada (*véase* Sección 22.13) y una buena prognosis. La enfermedad de Hansen en ambas formas expuestas y las formas intermedias entre ambos extremos se trata usando una terapia a base de varios medicamentos (MDT), donde se incluyen combinaciones de dapsona (4,4′-sulfonilbisbenceneamina), rifampicina y clofacimina. Como en el caso de la tuberculosis, han aparecido organismos resistentes a estos medicamentos, especialmente en tratamientos inadecuados o con un único compuesto. Para la erradicación de este microorganismo son necesarios tratamientos durante más de un año y con protocolos que combinen varios medicamentos.

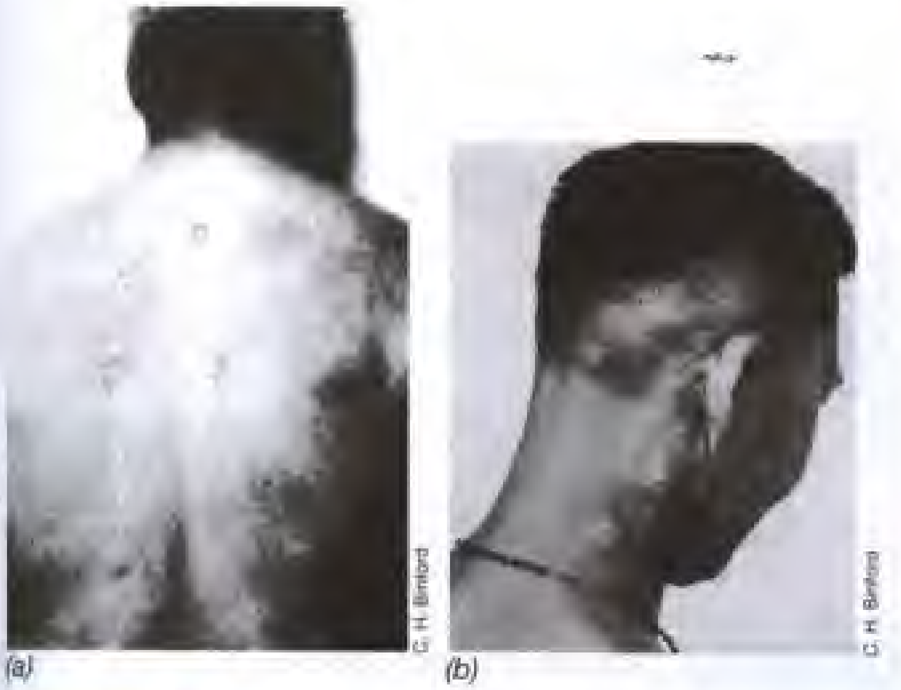


Figura 26.10 Lesiones típicas de la lepra en la piel debidas a la infección con *Mycobacterium tuberculosis*.

La patogeneidad de *M. leprae* es probablemente debida a una combinación entre un fenómeno de hipersensibilidad retardada (*véase* Sección 22.13) y la colonización del microorganismo. La transmisión, probablemente, combine el contacto directo con las vías respiratorias, y el periodo de incubación varía entre algunas semanas hasta años o incluso décadas. *M. leprae* crece en el interior de los macrófagos, causando una infección intracelular que puede dar lugar a una enorme cantidad de bacterias en el interior de la piel. En muchas zonas del mundo la incidencia de la enfermedad de Hansen es muy baja. Por ejemplo, en los Estados Unidos se diagnostican al año menos de 300 casos. Las áreas de mayor incidencia se concentran en América Central y del Sur, África y el sudeste asiático. Actualmente existen 1,2 millones de personas diagnosticadas con lepra, y 500 000 nuevos casos al año. Sin embargo se piensa que puede haber hasta 12 millones de casos de lepra sin diagnosticar en todo el mundo.

Otras especies de *Mycobacterium* patógenas

Un patógeno común del ganado vacuno, *Mycobacterium bovis*, afecta también a humanos, además de a otros animales. La vía de entrada en humanos de *M. bovis* es el tracto intestinal, normalmente por la ingestión de leche cruda. Después de una infección intestinal localizada, el microorganismo eventualmente se dispersa hasta el tracto respiratorio iniciando los síntomas típicos de la tuberculosis. No se sabe realmente si *M. bovis* es un organismo diferente a *M. tuberculosis* ya que experimentos de hibridación de ambos genomas indican que son prácticamente idénticos con un 100% de identidad en cuanto a su secuencia de ADN (*véase* Sección 11.9). La pasteurización de la leche y la eliminación de los animales enfermos han erradicado, prácticamente, la transmisión de la tuberculosis de ganado bovino a humanos.

Otras especies de *Micobacterium* son ocasionalmente patógenos humanos. Por ejemplo, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. chelonae* y otros miembros del género (Sección 12.24). La tuberculosis debida a los microorganismos del complejo de *M. avium* (MAC) son particularmente prevalentes en pacientes con SIDA, en comparación con el resto de la población (*véase* Sección 26.15).

✓ 26.5 Revisión de conceptos

La tuberculosis es una de las más importantes y peligrosas enfermedades en el mundo. Su incidencia está aumentando en los países desarrollados debido a la aparición de cepas resistentes a los medicamentos empleados en su control. La patología de la tuberculosis y la lepra está influenciada por la respuesta inmunitaria celular.

- ✓ ¿Por qué *Mycobacterium tuberculosis* es un patógeno respiratorio tan extendido?
- ✓ Describa los factores que contribuyen a la incidencia de resistencias a los medicamentos en las infecciones por micobacterias.

26.6 *Neisseria meningitidis*, meningitis y meningococemia

La **meningitis** es una inflamación de las *meninges*, membranas que recubren el sistema nervioso central, especialmente la médula espinal y el cerebro. La meningitis puede ser causada por infecciones bacterianas o víricas, o incluso puede ser aséptica, no causada por ningún agente infeccioso. Aquí vamos a centrarnos en las meningitis causadas por bacterias, principalmente *Neisseria meningitidis*, y una infección relacionada llamada **meningococemia**.

Biología

Neisseria meningitidis, a menudo llamada meningococo, es un diplococo encapsulado, Gram negativo, no esporulado aeróbico estricto y oxidasa positivo (Figura 26.11). Se conocen, al menos, 13 cepas patógenas distintas de *N. meningitidis*, basadas en las diferencias antigénicas de los polisacáridos de su cápsula.

Epidemiología y patogenia

La meningitis meningocócica a menudo aparece como epidemias, habitualmente en colectivos cerrados tales como instalaciones militares o colegios. Normalmente afecta a adolescentes o a adultos jóvenes. En una población normal, más del 30% de los individuos tienen *Neisseria meningitidis* en la zona nasofaríngea, sin síntomas aparentes de enfermedad. En situaciones de epidemia este porcentaje se eleva hasta el 80%. El determinante que posibilita el paso de portador asintomático a enfermo agudo no se conoce. En una infección meningocócica aguda, la bacteria es transmitida por el hospedador, habitualmente a través del aire, se adhiere a las células de la zona nasofaríngea, y desde ahí accede al torrente sanguíneo causando septicemia y una simple infección del tracto respiratorio. La septicemia, en algunas ocasiones, determina una fulminante meningococcemia, caracterizada por coagulación intravascular, shock y muerte en el 17% de los casos. La meningitis es otra seria manifestación de la infección. La meningitis se caracteriza por un repentino dolor de cabeza, vómitos y rigidez en el cuello, y puede evolucionar a coma y muerte en pocas horas. Los casos de muerte representan el 3% de los pacientes de meningitis meningocócica aguda.

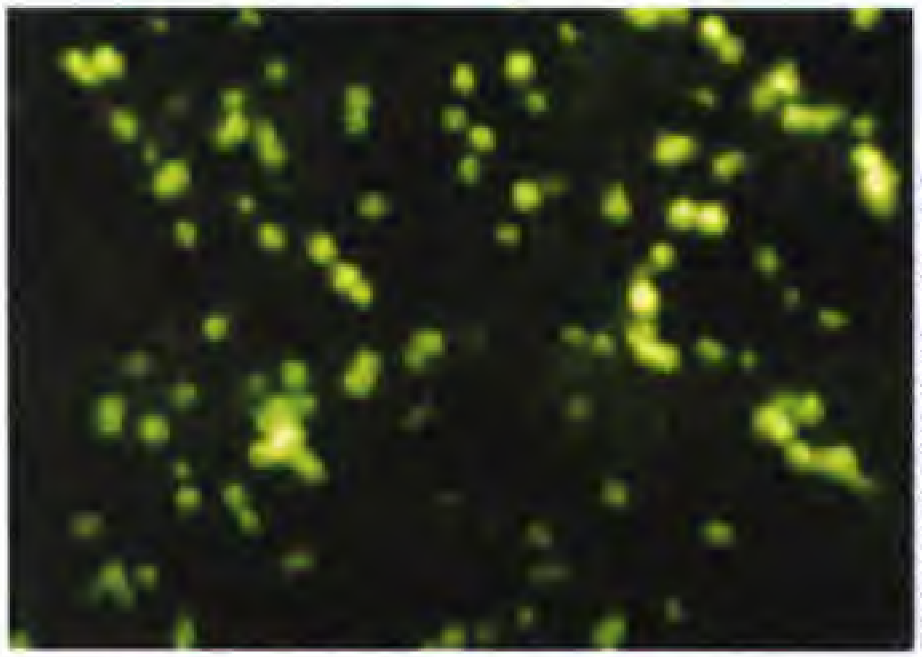


Figura 26.11 Tinción con anticuerpos fluorescentes de *Neisseria meningitidis*, el microorganismo causante de meningitis y meningococemia en adultos. Las bacterias has sido obtenidas del líquido cefalorraquídeo de un paciente infectado. Los cocos individuales tienen alrededor de 0,6 a 1,0 μm de diámetro.

CDC/Dr. M.S. Mitchell, Public Health Image Library, PHIL

En la Figura 26.12 se muestra la prevalencia de infecciones meningococicas agudas en los Estados Unidos durante los últimos 30 años. Se recogen 2500 casos de enfermedades meningococicas agudas por año con una mortalidad total en torno al 10%.

Diagnóstico

Muestras aisladas de exudados nasofaríngeos, sangre o líquido cefalorraquídeo son inoculados en un medio de cultivo llamado «medio modificado» de Thayer-Martin (MTM) (Sección 24.1); se trata de un medio selectivo que suprime el crecimiento de la mayoría de la biota normal, pero permite el crecimiento de *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonnorheae*. Las colonias formadas por diplococos Gram negativos y oxidasa positivos (Tabla 24.3) son identificadas como presuntas *Neisseria*. Sin embargo debido a la rápida evolución de la enfermedad, los diagnósticos preliminares se basan generalmente en los síntomas clínicos y el tratamiento se inicia sin la confirmación por los tests de cultivo.

Prevención y tratamiento

La penicilina G es el antibiótico de elección para el tratamiento de las infecciones por *Neisseria meningitidis*. No obstante ya se ha registrado la presencia de cepas resistentes. El cloranfenicol es el agente alternativo de tratamiento de infecciones en individuos sensibles a la penicilina. Existen nu-

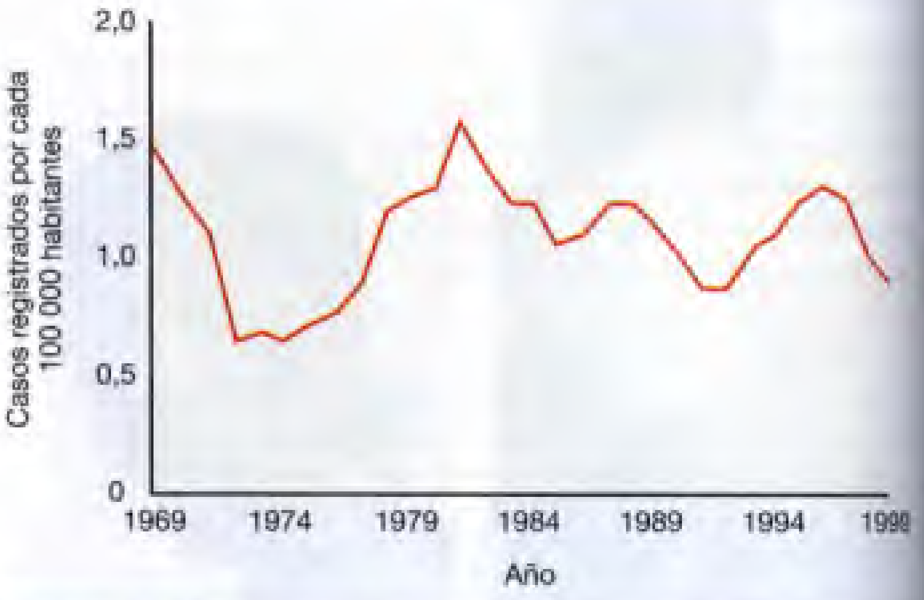


Figura 26.12 Incidencia de infecciones meningocócicas en los Estados Unidos. En 1998 se registraron 2725 casos de miningococcemia o meningitis, el resultado fue de 234 muertos. Los datos son del Centro de Control y Prevención de Enfermedades, Atlanta, GA, EE.UU.

merosas cefalosporinas de amplio espectro que son también efectivas. De forma natural aparecen anticuerpos específicos frente a una cepa en infecciones subclínicas que son efectivos en la prevención de la infección en la mayoría de los adultos. Desafortunadamente no se dispone de vacunas de larga duración para prevenir la meningitis o la meningococemia. No obstante, se dispone de vacunas consistentes en polisacáridos purificados de una de las más importantes cepas patógenas que se emplean para inmunizar a personas de riesgo cuando surge un brote epidémico. La vacuna también se administra para prevenir la infección de ciertas poblaciones susceptibles, como los militares o estudiantes que viven en residencias. Además, la rifampicina se emplea como antibiótico en la quimioprofilaxis para prevenir la enfermedad en personas cercanas o familiares de un individuo infectado.

Otras causas de meningitis

Existen otros organismos que también pueden producir meningitis. Meningitis aguda es habitualmente causada por una de las bacterias piogénicas como el *Staphylococcus*, *Streptococcus* o *Haemophilus influenza*. *H. Influenza* infecta primariamente a niños pequeños. Se dispone de una vacuna efectiva para prevenir la meningitis cuasada por *H. Influenza*, la cual es obligatoria en los Estados Unidos para los niños en edad escolar (Sección 22.11).

Diferentes virus pueden causar meningitis, entre ellos destacan el virus del herpes simple (HSV) el virus linfocítico coriomeningítico (LCM), el virus de las paperas y los enterovirus. En general, la meningitis vírica es menos severa que la bacteriana.

✓ 26.6 Revisión de conceptos

Neisseria meningitidis es el más común causante de meningococemia y meningitis en adultos jóvenes, apareciendo ocasionalmente como brotes epidémicos en poblaciones cerradas. La meningitis y meningococemia bacterianas son enfermedades muy graves con elevados índices de mortalidad. Aunque los tratamientos actuales y las estrategias de prevención están en camino de acabar con los brotes epidémicos, no se dispone aún de una vacuna multivalente efectiva.

- ✓ Describa la infección por *Neisseria meningitidis* y cómo se desarrolla hasta la meningococemia.
- ✓ ¿Puede prevenirse la meningococemia? Explique cómo puede realizarse.

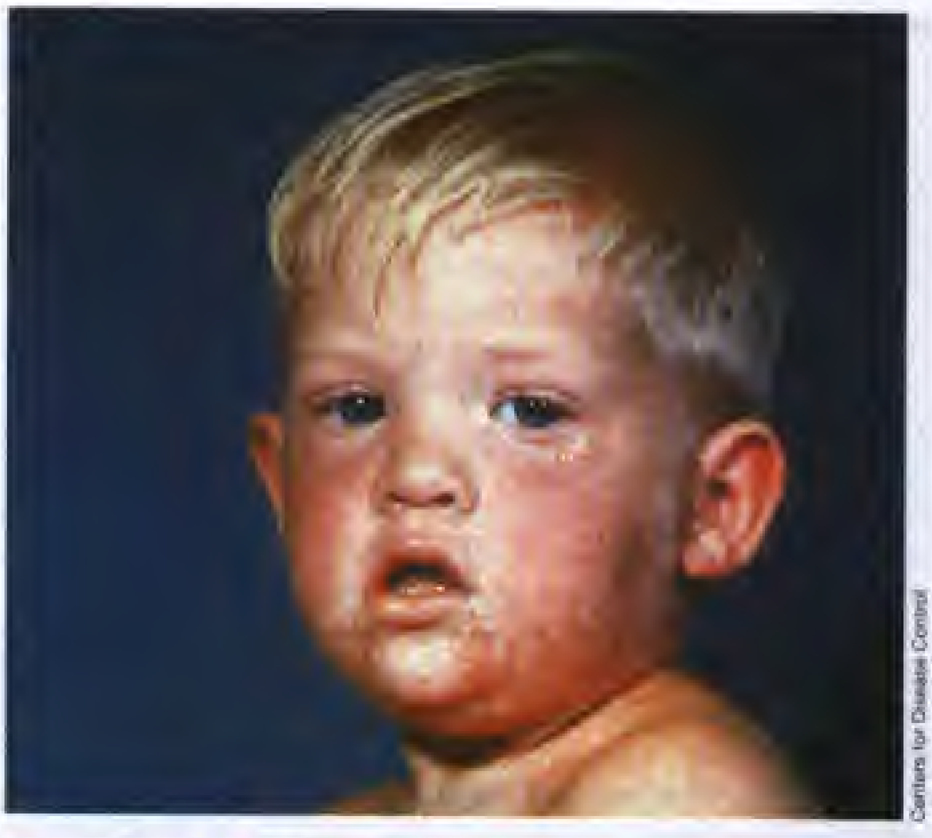
26.7 Virus e infecciones respiratorias

Como ya hemos explicado (*véase* Sección 20.10), los virus son más difíciles de controlar por medios quimioterapeúticos que las bacterias u otros microorganismos, ya que se encuentran íntimamente relacionados con las funciones de las células del hospedador. Por ello, la mayoría de los medicamentos que atacan a los virus también causan daño en las células del hospedador. Por esto no es sorprendente que en los países evolucionados las infecciones más frecuentes tengan etiología vírica. La mayoría de las enfermedades víricas son agudas y localizadas, sin embargo, algunas pueden ser problemáticas en adultos normales sanos. Muchas enfermedades víricas importantes, tales como la viruela y la rabia, han sido controladas gracias a la inmunización. Empezaremos en este apartado discutiendo: sarampión, paperas, rubéola y varicela; todas estas enfermedades víricas se transmiten a través de pequeñas gotas de agua por el aire y todas se controlan mediante inmunización.

Sarampión

El virus del sarampión produce una enfermedad aguda y muy contagiosa en niños, caracterizada por secreciones nasales, enrojecimiento de los ojos, tos y fiebre. El virus del sarampión es un paramixovirus (morbilivirus), virus RNA de cadena sencilla lineal, de polaridad negativa, familia *Paramyxoviridae*, género *Morbillivirus* (*véase* Sección 16.8), que entra por la nariz o garganta a través del aire, dando lugar a una rápida viremia. La enfermedad progresa con tos intensa, fiebre y un intenso sarpullido (Figura 26.13); en la mayoría de los casos el sarampión dura entre 7 y 10 días. Anticuerpos circulantes frente al virus del sarampión se localizan 5 días después de la aparición de la enfermedad y tanto los anticuerpos circulantes como los linfocitos T citotóxicos (*véanse* Secciones 22.8 y 22.6) se unen en la eliminación del virus. Debido al sarampión pueden aparecer complicaciones que incluyen infecciones en el oido interno, neumonía y, en raros casos, encefalomielitis. La encefalomielitis puede producir desórdenes neurológicos y una forma de epilepsia, y tiene una mortalidad cercana al 20%.

Aunque en tiempos recientes se trataba de una enfermedad muy común entre los niños, el sarampión actualmente aparece en brotes muy localizados debido a los generalizados programas de inmunización, que comenzaron a mediados de los años sesenta (Figura 26.14a). En los Estados Unidos, debido al carácter tan infeccioso del sarampión, todas las escuelas públicas exigen las pruebas de inmunización frente al sarampión antes de aceptar a un niño.



Centers for Disease Control

Figura 26.13 Erupción típica asociada con el sarampión en niños.

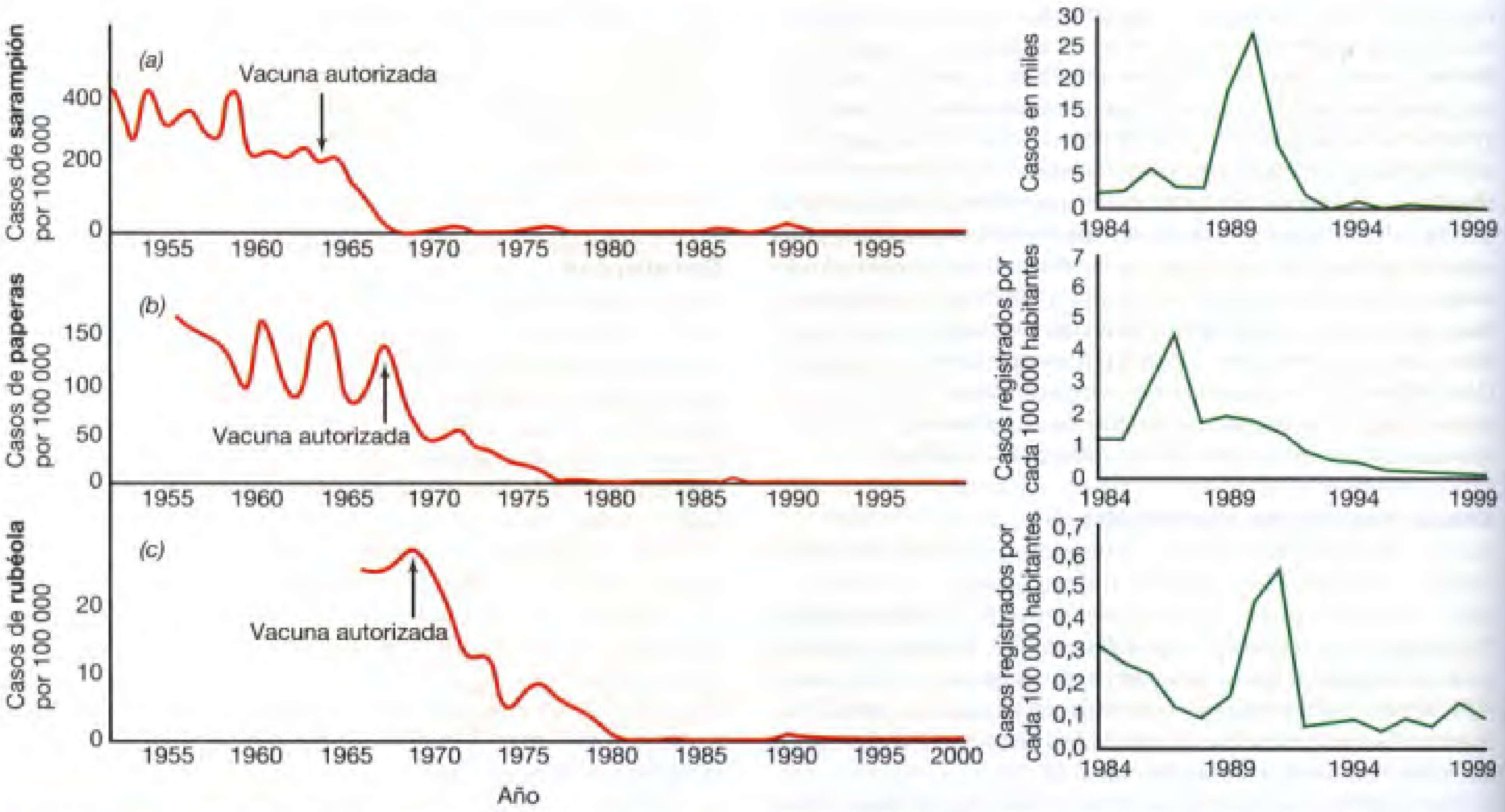


Figura 26.14 Efecto de las vacunas en la incidencia de las más importantes enfermedades víricas en los niños, actualmente controladas por la vacuna triple vírica, en los Estados Unidos (sarampión, paperas, rubéola). (a) Sarampión. (b) Paperas. (c) Rubéola. Las gráficas pequeñas muestran una imagen más detallada de estas enfermedades. Los datos fueron obtenidos por los Centros de Control de Enfermedades de los Estados Unidos, Atlanta, GA, EE.UU.

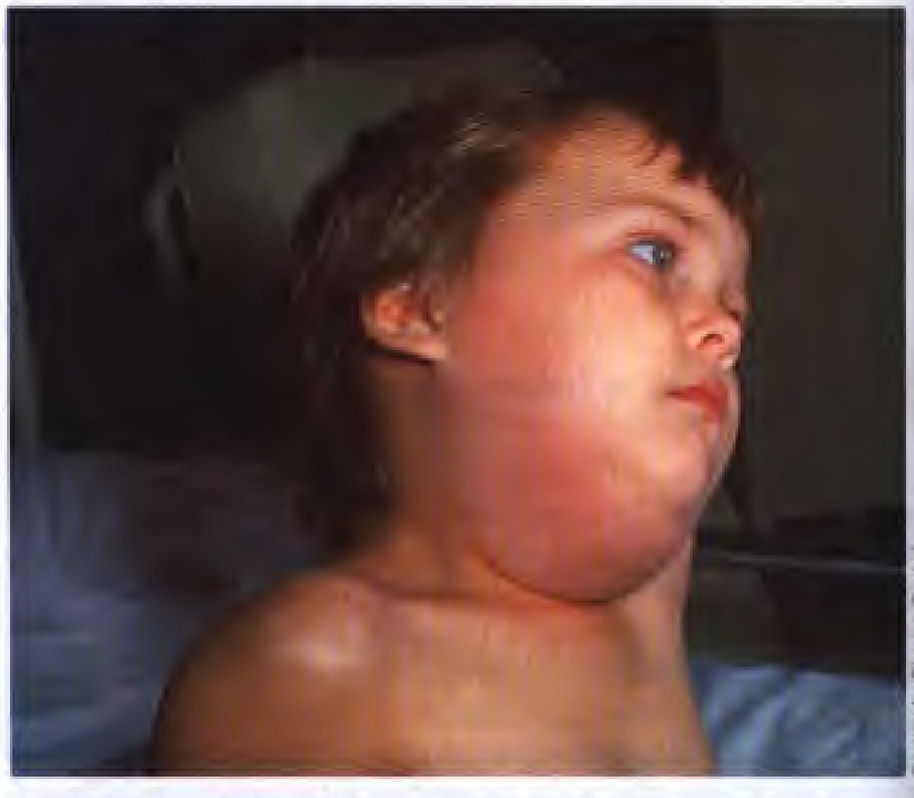
La inmunización activa se consigue mediante la vacuna triple vírica (sarampión, paperas y rubéola) (*véase* Sección 22.11). Cuando un niño sufre el sarampión, la inmunización que consigue, generalmente, le protege frente a reinfecciones durante toda la vida.

Paperas

Las paperas son causadas por otro paramixovirus (rubulavirus), virus RNA de de cadena sencilla lineal, de polaridad negativa, familia *Paramyxoviridae*, género *Rubulavirus* muy contagioso diferente al causante del sarampión. El virus de las paperas se transmite por pequeñas gotitas de agua a través del aire, la enfermedad se caracteriza por una inflamación de las glándulas salivares produciendo la inflamación de las mandíbulas y del cuello (Figura 26.15). El virus puede dispersarse a través del torrente sanguíneo infectando otros órganos como el cerebro, los testículos y el páncreas. Complicaciones severas pueden incluir encefalitis y más raramente esterilidad. La respuesta inmunitaria del hospedador produce anticuerpos frente a las proteínas de superficie del virus y generalmente determina una rápida recuperación. Un vacuna compuesta de virus atenuados es muy efectiva en la prevención de la enfermedad (Figura 26.14*b*). Por tanto, al igual que el sarampión, la incidencia de las paperas en los países desarrollados ha experimentado un gran descenso en las últimas tres décadas, quedando reducida casi exclusivamente a individuos que no recibieron la vacuna triple vírica durante la infancia.

Rubéola

La rubéola (sarampión alemán) es causada por un rubivirus, virus RNA de cadena sencilla lineal, de polaridad positiva, de la familia *Togaviridae*, género *Rubivirus* (*véase* Sección 16.7) Los síntomas de la enfermedad recuerdan a los del sarampión



Centers for Disease Control

Figura 26.15 Típica hinchazón glandular asociada a las paperas.

pero generalmente son más suaves. La rubéola es menos contagiosa que el sarampión y por tanto una buena proporción de la población nunca ha sufrido esta infección. Sin embargo durante los últimos tres meses de embarazo el virus de la rubéola puede infectar al feto a través de la placenta y dar lugar a importantes malformaciones. La rubéola puede producir *la muerte del feto*, sordera, defectos en el corazón y en los ojos y daños cerebrales en nacidos vivos. Así pues, es importante que las mujeres embarazadas estén inmunizadas frente a este virus, por ello se lleva a cabo una inmunización rutinaria de los niños frente a esta enfermedad. La vacuna consta de un virus atenuado junto con los virus atenuados del sarampión y las paperas en la vacuna triple vírica mencionada previamente. (*véanse* Figura 26.14c y Sección 22.11).

Varicela y herpes

La varicela es una enfermedad infantil muy común causada por un herpesvirus, virus DNA de doble cadena lineal, de la familia *Herpesviridae*, género *Varicellovirus* (HH3, Herpesvirus Humano 3) (*véase* Sección 16.11). La varicela es muy contagiosa, especialmente cuando individuos susceptibles están en contacto; el contagio es por el aire a través de pequeñas gotas de líquido infectadas. En escolares, por ejemplo, el confinamiento en las clases durante los meses de invierno permite el esparcimiento del virus de la varicela por secreciones transmitidas por el aire de los compañeros infectados. El virus entra por el tracto respiratorio, se multiplica rápidamente y se distribuye a través del torrente sanguíneo dando lugar a las pápulas típicas que rápidamente cicatrizan y raramente dejan marcas (Figura 26.16). Una vacuna a base del virus atenuado es actualmente recomendada en los Estados Unidos (*véase* Sección 22.11). La incidencia actual de la varicela es en torno a un tercio de los casos que existían antes de 1994, el año en que se extendió la inmunización (Figura 26.17).

El virus de la varicela puede permanecer en estado quiescente en células nerviosas durante años sin síntomas aparentes. Los virus ocasionalmente pueden migrar desde los reservorios a la piel, causando una dolorosa erupción conocida como *herpes zoster*. El herpes comúnmente afecta a individuos inmunodeprimidos o ancianos. Estudios con voluntarios humanos sugieren que las células T son importantes en la destrucción del virus. El uso profiláctico de globulinas hiperinmunes humanas preparadas frente al virus son eficaces para prevenir la aparición de los síntomas del herpes. Esta terapia es sólo recomendada en pacientes donde infecciones secundarias ocasionalmente asociadas con el herpes, tales como neumonía o encefalitis, pueden hacer peligrar su vida.

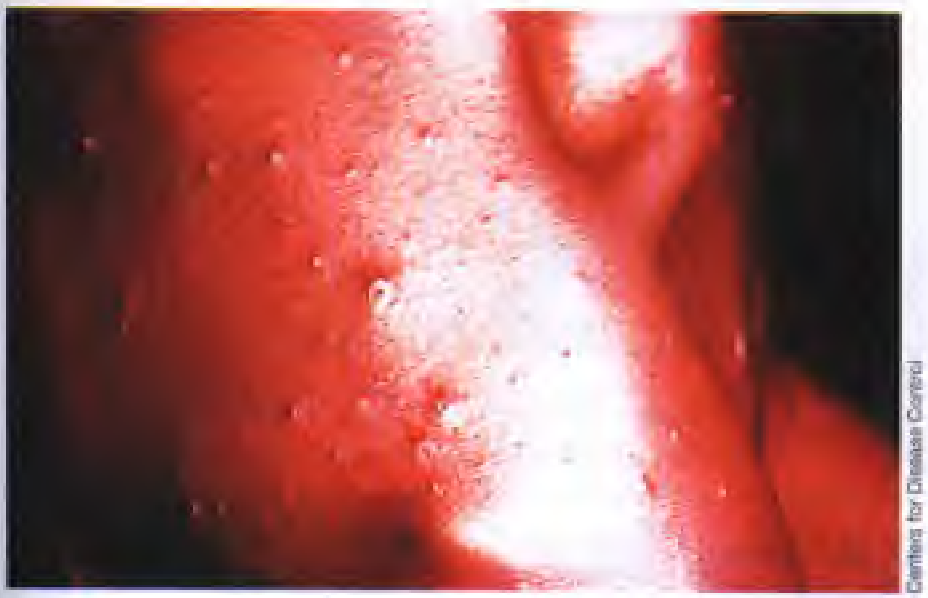

Centers for Disease Control

Figura 26.16 Pápulas asociadas a la varicela.

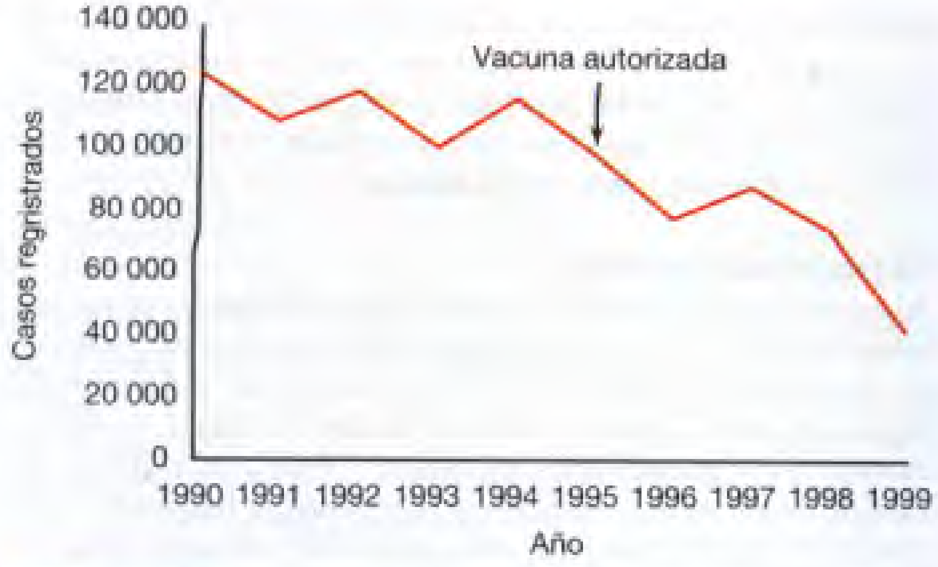


Figura 26.17 Incidencia de la varicela en los Estados Unidos entre 1990 y 1999. La vacuna frente a la viruela se introdujo en 1995, en los 5 años siguientes la incidencia de la enfermedad se redujo en un 30% del total de casos detectados antes de que la vacuna estuviera disponible. Los datos fueron obtenidos de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, Atlanta, Georgia, EE.UU.

✓ 26.7 Revisión de conceptos

Las enfermedades respiratorias víricas son muy infecciosas y pueden causar problemas de salud serios. No obstante las muy comunes enfermedades víricas que afectan principalmente a los niños como son el sarampión, las paperas, la rubéola y la varicelas son controlables mediante una apropiada inmunización.

- ✓ Diga cuándo se dispuso de la inmunización para sarampión, paperas, rubéola y varicela.
- ✓ Describa las complicaciones graves que tienen las infecciones por estos virus.

26.8 Resfriados y gripe

Los resfriados y la gripe son las enfermedades víricas infecciosas más comunes. Como se muestra en la Figura 26.18, hay alrededor de dos casos de gripe por cada enfermedad

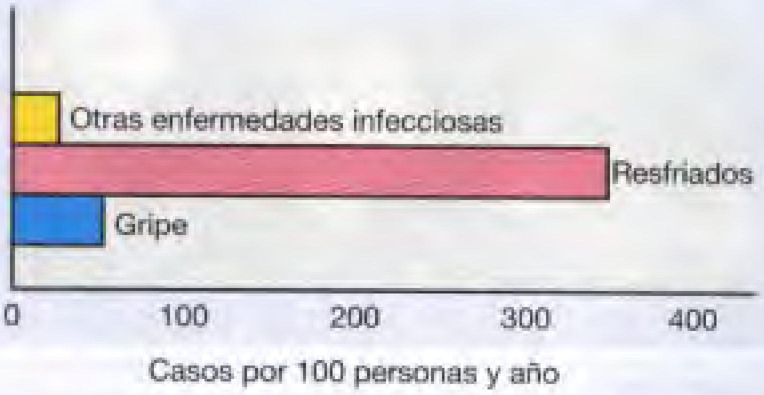
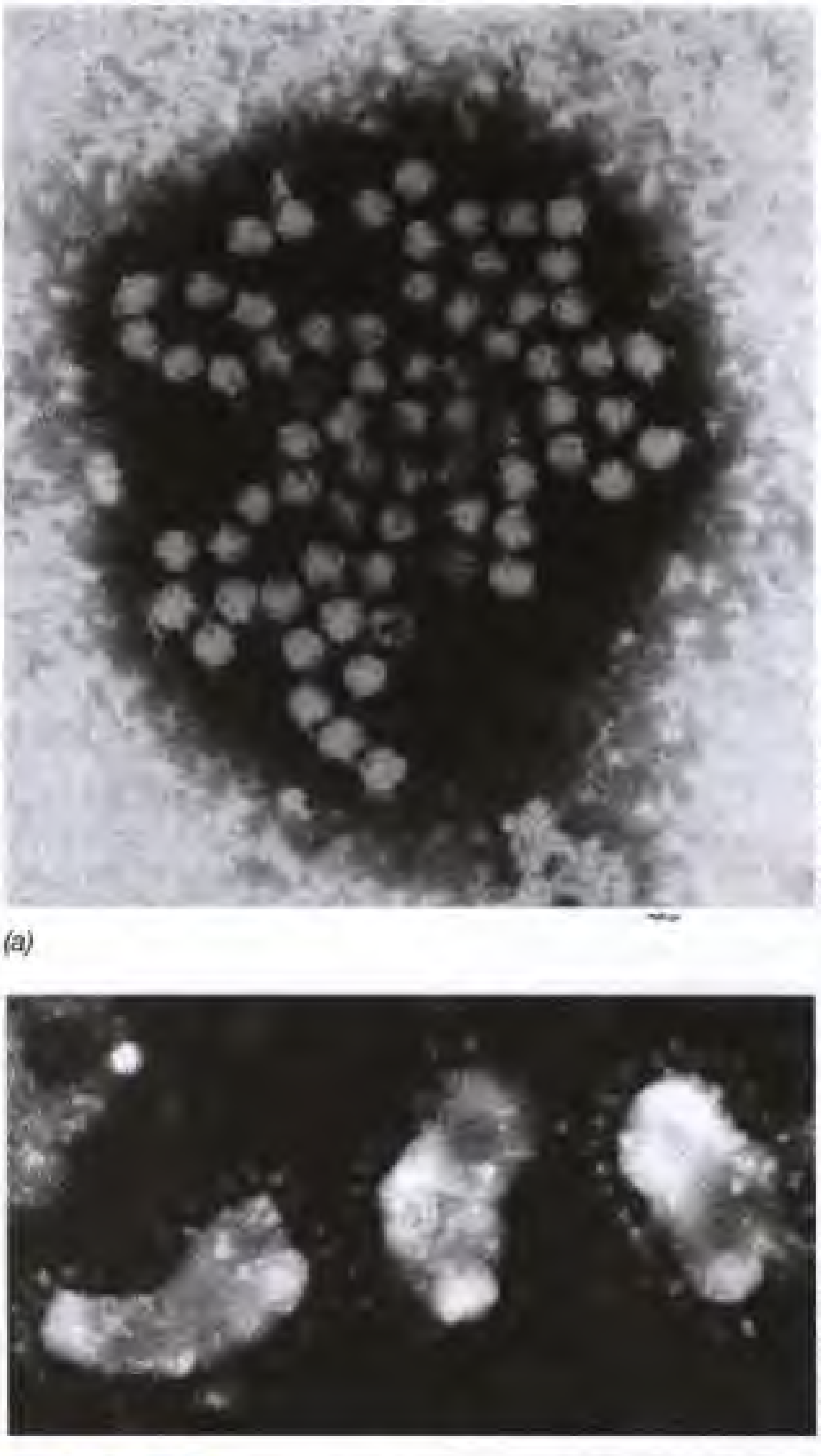


Figura 26.18 Los virus del resfriado común y de la gripe son las causas más importantes de enfermedades infecciosas en los Estados Unidos. Los datos son los típicos de los años recientes.

infecciosa. Hay alrededor de 15 resfriados por cada una de las otras enfermedades infecciosas. Ambas enfermedades respiratorias se transmiten vía las pequeñas gotas de líquido esparcidas por las personas infectadas por las toses, estornudos o secreciones respiratorias.

El resfriado común

Algunas estimaciones sugieren que cada persona, en término medio, padece más de tres resfriados por año a lo largo de su vida (Figuras 26.18) Los síntomas del resfriado incluyen rinitis (inflamación de la región nasal, especialmente de las membranas mucosas), obstrucción nasal, secreción nasal acuosa y mal estado general, habitualmente sin fiebre. Los rhinovirus, virus con RNA de cadena sencilla de polaridad positiva, de la familia *Picornaviridae*, género *Rhinovirus*, (*véanse* Figura 26.19*a* y Sección 16.7), son los causantes más comunes de los resfriados. Se han identificado al menos 115 serotipos diferentes de rhinovirus. Otro grupo de virus con RNA de cadena sencilla, polaridad positiva, los coronavirus (familia *Coronaviridae*, género *Coronavirus*, coronavirus humanos 229E y OC43) (Figura 26.19*b*), son los responsables de alrededor del 15% de los resfriados en adultos. Otros virus, entre los que están adenovirus, coxsackie, virus sincital respiratorio y ortomixovirus, son responsables de alrededor del 10% de los resfriados comunes. Los resfriados generalmente inducen una específica, local, respuesta de IgA (*véase* Sección 22.8). El elevado número de agentes infecciosos potenciales hacen que la inmunización sea casi imposible.



B. Dowsett y D. Tyrell

Heather Davies y D. Tyrell

Figura 26.19 Micrografías electrónicas de algunos virus del resfriado común. (a) Rinovirus humanos. (b) Coranovirus humanos. Cada virión de rinovirus mide alrededor de 30 nm de diámetro. Cada virión de coronavirus mide en torno a 60 nm de diámetro.

La transmisión más probable es a través de aerosoles, aunque experimentos con voluntarios sugieren que el contacto directo es también un importante medio de transmisión. La mayoría de los medicamentos antivíricos son inefectivos, pero un derivado de la piramicina (Figura 26.20*a*) parece prometedor en la prevención de la infección después de la exposición al virus. Además, nuevos medicamentos antivíricos están siendo diseñados basándose en las estructuras tridimensionales de dichos virus. Por ejemplo, el fármaco WIN 52084, un antirrinovirus (Figura 26.20*b*) se une al virus, cambiando su estructura tridimensional superficial y destruyendo el sitio de unión a la superficie de la célula hospedador, impidiendo la infección. El interferón α, una citoquina (*véase* Sección 23.10), es también efectivo en la prevención de la aparición del resfriado. Así pues, existen diferentes posibilidades experimentales para la prevención y el tratamiento de los resfriados, pero ninguna de ellas es comúnmente aceptada por no ser muy efectivas ni seguras. El tratamiento aceptado para los resfriados consiste en aliviar los síntomas, principalmente las descargas nasales, con una amplia variedad de antihistaminas y medicamentos descongestionantes.

Gripe

La gripe es causada por un virus con RNA como material genético del grupo de los ortomixovirus, de la familia *Orthomixoviridae*, género *Influenzavirus* (*A, B, C*) (*véase* Sección 16.8). El virus de la gripe es un virus con envoltura, con

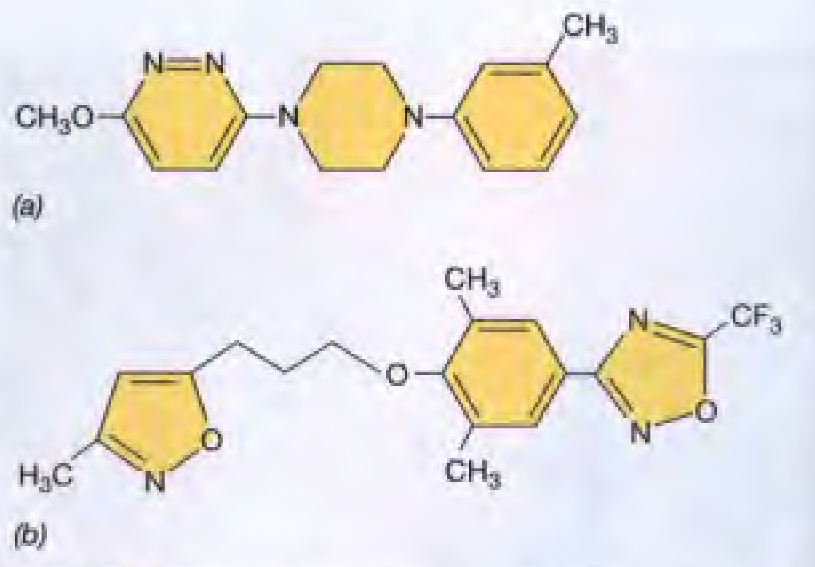


Figura 26.20 Fármacos experimentales antirrinovirus. (a) Estructura del 3.metoxi-6-[4-(metilfenil)]-1-piper-azinil. (b) Estructura del WIN 52084, un fármaco que bloquea de la unión al receptor.

Atención a ... ¿Resfriado común o gripe?

Los síntomas de un resfriado común y de la gripe a menudo son similares, pero ambas enfermedades son distintas y están causadas por virus diferentes. Un resfriado típico es causado por un rinovirus y está asociado con descargas nasales, tos, escalofríos y tal vez dolor de garganta. La gripe, causada por ortomixovirus, está generalmente asociada con un grupo diferente de síntomas. Aunque ambas enfermedades pueden ser similares, los resfriados suelen ser de menor duración y los síntomas son más suaves. Lo siguiente puede servir como guía para saber si se ha «cogido un resfriado» o si se «tiene la gripe». ■

Síntomas	Resfriado común	Gripe
Fiebre	Raro	Común (39-40°C), repentino
Dolor de cabeza	Raro	Común
Malestar general	Suave	Común, a veces muy severo, puede durar varias semanas
Descargas nasales	Común y abundante	Menos común, poco abundante
Dolor de garganta	Común	Mucho menos común
Vómitos o/y diarrea	Raro	Común

RNA de cadena sencilla lineal, polaridad negativa, genoma segmentado (fragmentado) y helicoidal, rodeado de una envoltura constituida por una proteína, una bicapa lipídica y glicoproteínas externas (*véanse* Figuras 26.21 y Figura 16.15). Existen tres tipos distintos de virus de la gripe, influenzavirus A, influenzavirus B e influenzavirus C. El más importante en humanos es el influenzavirus A, por lo que limitaremos nuestra explicación a este virus.

El material genético del virus de la influenza A está formado por RNA de cadena sencilla lineal de polaridad negativa y empaquetado de una forma poco habitual. Como se explicó en la Sección 16.10, el genoma del virus de la gripe está *segmentado* (fragmentado) con los genes repartidos en los ocho segmentos de RNA monocatenario (*véanse* Figura 16.15 y Sección 16.8). Esta organización permite el rápido y constante intercambio de genes entre las distintas cepas del virus de la gripe, teniendo además en cuenta que una célula puede ser infectada por más de un virus al mismo tiempo. El intercambio de genes tiene como resultado el fenómeno que se conoce como *cambio antigénico*. El cambio antigénico determina modificaciones en las proteínas de la cubierta de los viriones, especialmente en dos de ellas, hemaglutinina y neuraminidasa, importantes para la unión a la célula hospedador y la posterior salida de los virus de las mismas respectivamente (*véanse* Figuras 16.15 y 26.21). En la hemaglutinina y la neuraminidasa también se producen cambios antigénicos menores debidos a mutaciones génicas, que resultan en el cambio de uno o más aminoácidos. Este fenómeno se conoce como **deriva antigénica**.

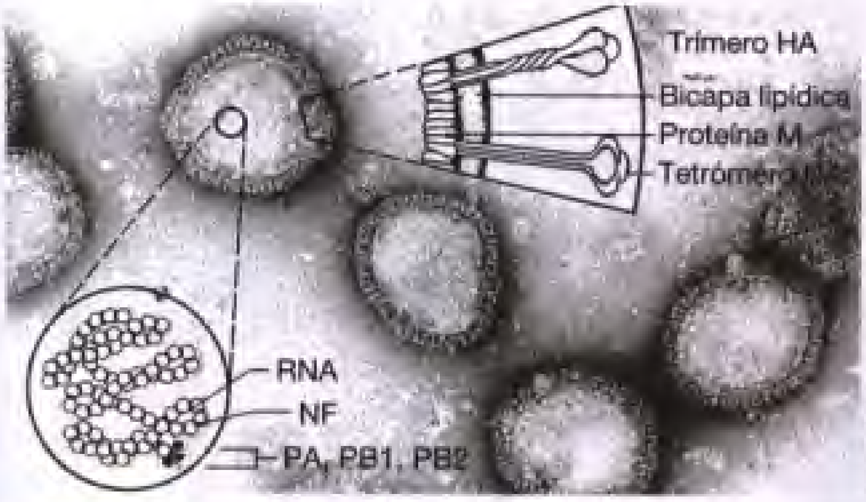


Figura 26.21 Micrografía electrónica del virus de la gripe, se muestra la localización de las proteínas mayoritarias de la cubierta y del ácido nucleico. Cada virión es de unos 100 nm de diámetro. HA, hemaglutinina (tres copias conforman la punta de la envuelta de HA); NA, neuraminidasa (cuatro copias conforman la punta de la envuelta de NA); M, proteína de la cubierta; NP, nucleoproteína; PA, PB1, PB2 y otras proteínas internas, algunas de las cuales pueden tener funciones enzimáticas.

El virus de la influenza humana es transmitido de persona a persona a través del aire, inicialmente en partículas líquidas expelidas al toser o estornudar. El virus infecta las membranas mucosas del tracto respiratorio superior y ocasionalmente invade los pulmones. Los síntomas incluyen fiebre ligera durante 3 a 7 días, escalofríos, fatiga, dolor de cabeza y malestar general (*véase* el apartado, «¿Resfriado común o gripe?»). La recuperación es espontánea y rápida. La mayoría de las consecuencias serias de la gripe ocurren debido a la invasión de bacterias como infección secundaria en personas cuyas defensas han sido mermadas por la infección del virus de la gripe. Especialmente en niños y personas mayores, la gripe es seguida por neumonía; la muerte, si llega a ocurrir, es debida a la infección bacteriana posterior. Después de la infección, la mayoría de los individuos se convierten en inmunes frente a ese virus y es imposible que una cepa con similares tipos antigénicos produzca epidemia durante más de 2 o 3 años. La inmunidad es muy dependiente de la producción de anticuerpos secretores (IgA) (*véase* Sección 22.8), especialmente frente a determinantes antigénicos de la hemaglutinina y la neuraminidasa

Los brotes de gripe tienen lugar cada año desde el final del otoño y durante todo el invierno debido a la *enfermedad vírica endémica* (*véase* Sección 25.3). La deriva antigénica resulta en una inmunidad reducida en la población y es responsable de la recurrencia de las *epidemias*, brotes de gripe severos ocurren en ciclos de entre 2 y 3 años. *Pandemias*, brotes de extensión mundial, ocurren mucho menos frecuentemente, entre 10 y 40 años y son resultado del cambio antigénico.

El brote de gripe, llamada gripe asiática, que afectó al mundo entero en 1957 proporcionó una oportunidad única para estudiar el desarrollo de una pandemia (Figura 26.22). La pandemia probablemente tuvo lugar por la aparición de una cepa mutante del virus antigénicamente distinta a todas las cepas que había en la población. Como no había inmunidad frente a esa cepa, el virus se expandió rápidamente por todo el mundo. Apareció en el interior de China a finales de febrero de 1957 y a finales de abril ya estaba en Hong-Kong llevado por refugiados chinos. Desde Hong-Kong y a través de las rutas navales y aéreas llegó a San Diego, California. En mayo hubo un brote en un barco en Newport, Rhode Island. Numerosos brotes fueron apareciendo a lo largo de los Estados Unidos. La máxima incidencia tuvo lugar en las últimas dos semanas de octubre en las que aparecieron 22 millones de casos. En la pandemia de 1918, la cepa de gripe A pudo aparecer como consecuencia de un reagrupamiento con un virus relacionado que infecta a los cerdos (gripe del cerdo). La cepa de 1957 también pudo aparecer debido al reagrupamiento con cepas de un reservorio animal.

Las epidemias de gripe pueden ser controladas mediante la inmunización. Sin embargo la elección de las vacunas apropiadas es muy complicado debido al gran número de cepas existentes y a la habilidad de éstas para sufrir cambios o deriva antigénica. Cuando aparece una nueva cepa, las vacunas no están disponibles inmediatamente, pero gracias a una cuidadosa vigilancia a lo largo de todo el mundo (Sección 25.8), se consiguen muestras de las más importantes cepas emergentes del virus de la influenza antes de que den lugar a un brote epidémico. En los Estados Unidos, preparaciones de tres cepas inactivadas son mezcladas para obtener una vacuna polivalente que es administrada antes de la siguiente temporada de gripe, que habitualmente comienza a finales del otoño y continua durante el invierno. La inmunización frente a la gripe se recomienda en individuos susceptibles de desarrollar infecciones secundarias graves, tales como los ancianos (más de 65 años), aquellos que sufren enfermedades crónicas degenerativas (pacientes con SIDA, *véase* Sección 26.14) y personal sanitario. La duración de la inmunización artificial de la vacuna de la gripe es habitualmente de unos pocos años y, por supuesto, es específica de la cepa. No obstante las inmunizaciones son actualizadas cada año.

La gripe puede también ser controlada mediante los fármacos *amantadina* y *ramantadina* (Sección 20.10 y Tabla 20.5). Estos fármacos inhiben la replicación vírica y se han usado como quimioprofilaxis para la prevención del esparcimiento de la gripe, sobre todo a las personas de alto riesgo. El tratamiento de la gripe con aspirina no es recomendado, porque hay evidencias de la unión entre tratamiento de la gripe con aspirina y el síndrome de Reye (una rara pero ocasionalmente fatal enfermedad que afecta al sistema nervioso central) en niños.

✓ 26.8 Revisión de conceptos

Los resfriados y la gripe son las enfermedades infecciosas más comunes. Aunque habitualmente no son enfermedades muy graves por ellas mismas, pueden favorecer la aparición de infecciones bacterianas secundarias.

- ✓ Comente las posibilidades de efectividad de los programas de inmunización frente a los resfriados comunes y la gripe.
- ✓ Defina y compare los síntomas de la gripe y de los resfriados comunes.

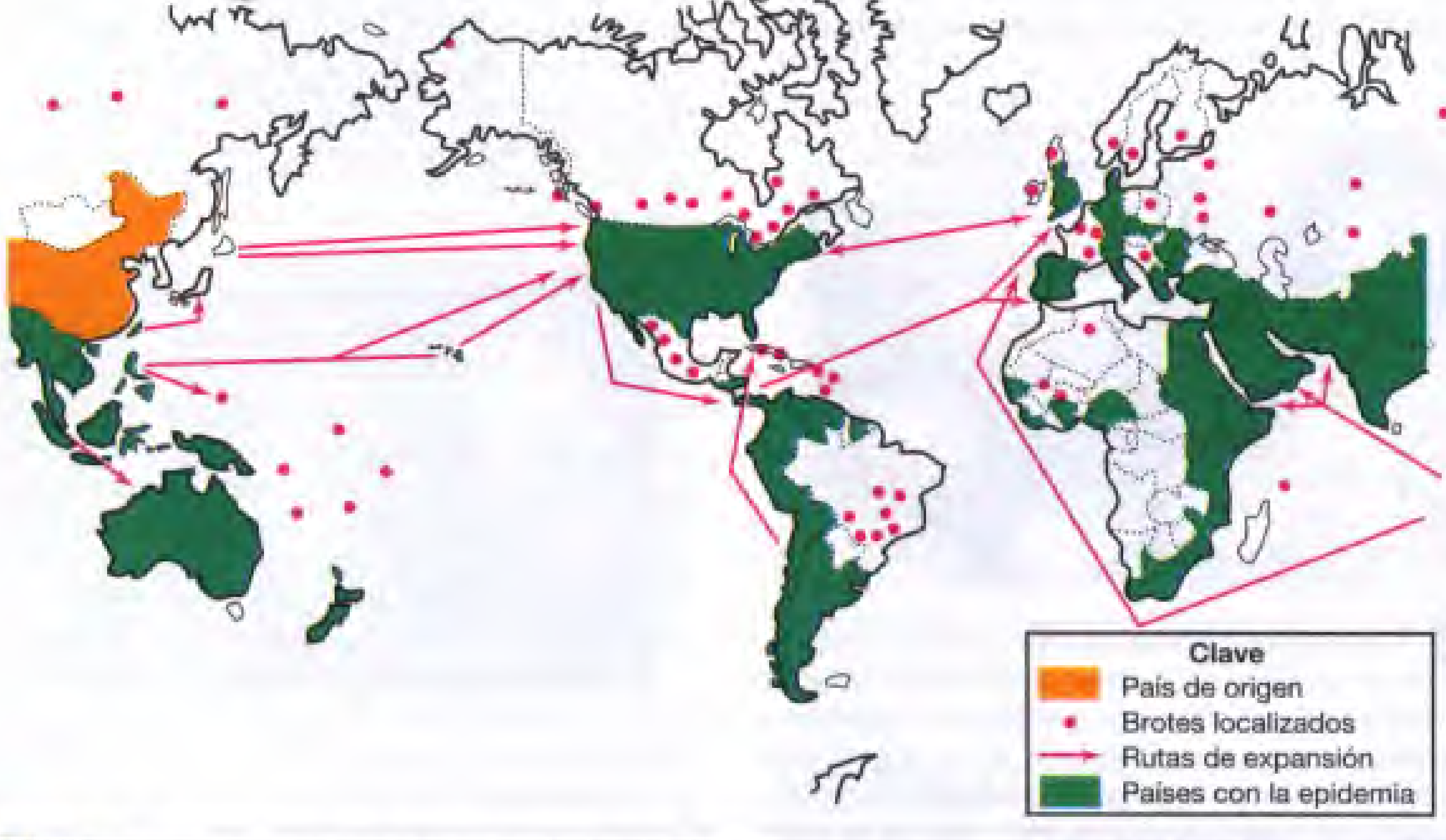


Figura 26.22 Ruta de expansión de la mayor epidemia de gripe, la pandemia de gripe asiática de 1957.

II TRANSMISIÓN DE ENFERMEDADES POR CONTACTO DIRECTO

Numerosas enfermedades se transmiten por contacto directo con una persona infectada o con su sangre o secreciones. Muchas de las enfermedades respiratorias que ya han sido tratadas pueden ser también transmitidas por contacto directo. Aquí vamos a discutir tres enfermedades que se extienden primariamente de persona a persona a través de un contacto directo con los individuos infectados.

26.9 Estafilococos

El género *Staphylococcus* contiene patógenos habituales de humanos y animales, que ocasionalmente comprometen la vida de los mismos. Las infecciones estafilocócicas normalmente son infecciones que afectan a la piel y a las heridas. La mayoría de las infecciones estafilocócicas resultan de la transmisión de los estafilococos de la biota normal de un individuo infectado pero asintomático a un individuo susceptible.

Biología

Los estafilococos son cocos Gram positivos de 0,8-1 μm de diámetro que se dividen en diversos planos dando lugar a grupos irregulares (Sección 12.20 y Figura 12.51). Los estafilococos son bacterias no esporuladas pero resistentes a la desecación y por ello fácilmente dispersables por las partículas de polvo a través del aire y las superficies. En humanos hay dos especies importantes: *Staphylococcus epidermidis*, una forma no pigmentada que se encuentra habitualmente sobre la piel o membranas mucosas, y *Staphylococcus aureus*, una forma con color amarillo. Ambas especies son patógenos potenciales, *S. aureus* está mucho más asociado con la producción de enfermedades. Ambas especies aparecen como parte de la biota bacteriana normal en la parte alta del tracto respiratorio y en la piel (Figura 26.2).

Epidemiología y patogénesis

Los estafilococos causan una importante variedad de enfermedades incluyendo acné, forúnculos (Figura 26.23), granos, impétigo (Figura 26.4), neumonía, osteomielitis, carditis, meningitis y artritis. Muchas de estas enfermedades causan la producción de pus, por ello se dice que son *supurativas* o formadoras de pus. Los *hábitat* más habituales de *Staphylococcus aureus* son el tracto respiratorio superior, especialmente la nariz, la garganta y la superficie de la piel. Muchos individuos sanos son portadores y en muchos casos los estafilococos residentes no causan enfermedad. No obstante los recién nacidos muchas veces son infectados durante la primera semana de vida por su madre o por otro contacto humano próximo. Infecciones estafilocócicas serias también tienen lugar cuando la resistencia del hospedador está deteriorada debido a cambios hormonales, otras enfermedades, heridas o tratamiento con esteroides, u otros fármacos que comprometen el sistema inmunitario.

Las cepas de *S. aureus* que causan enfermedades producen una serie de enzimas o toxinas extracelulares (Sección 21.9). Al menos cuatro diferentes *hemolisinas* han sido reconocidas. La producción de hemolisisnas es responsable de la hemólisis que se aprecia alrededor de las colonias creciendo en placas de agar sangre. *S. aureus* es capaz de producir una *enterotoxina* asociada con enfermedades transmitidas por los alimentos (Secciones 21.9, 22.14 y 29.4).

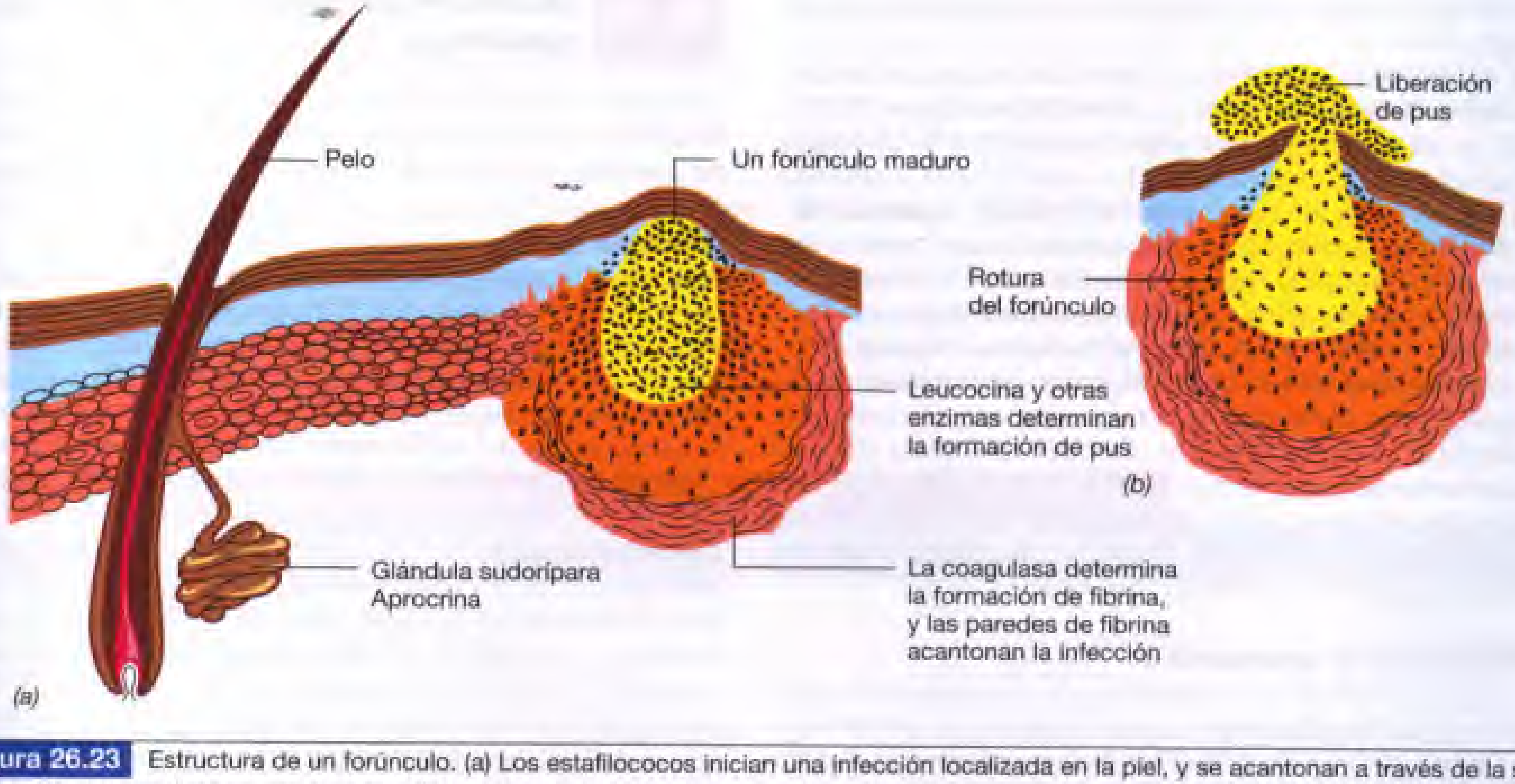

Pelo
Un forúnculo maduro
Liberación de pus
Rotura del forúnculo
Leucocina y otras enzimas determinan la formación de pus
(b)
Glándula sudorípara Aprocrina
La coagulasa determina la formación de fibrina, y las paredes de fibrina acantonan la infección
(a)

Figura 26.23 Estructura de un forúnculo. (a) Los estafilococos inician una infección localizada en la piel, y se acantonan a través de la sangre coagulada y las fibrinas por la acción de la coagulasa. (b) La ruptura del forúnculo libera pus y bacterias.

Otra sustancia producida por *S. aureus* es la *coagulasa* una enzima que produce la coagulación de la fibrina formando un coágulo (Sección 21.8). La producción de coagulasa es generalmente asociada con la patogeneidad. Los coágulos inducidos por la coagulasa dan lugar a la acumulación de fibrina alrededor de las bacterias haciendo muy difícil el contacto de los agentes inmunitarios del hospedador con las células bacterianas y por tanto hace a los estafilococos resistentes a la fagocitosis (Figura 26.23). La mayoría de las cepas de *S. aureus* también producen leucocidina, que produce la destrucción de los leucocitos. La producción de leucocidina en lesiones de la piel, tales como quemaduras o granos resultan en una considerable destrucción de células, siendo uno de los factores responsables de la formación de pus (Figura 26.23). Algunas cepas de *S. aureus* también producen otros factores de virulencia extracelulares incluyendo enzimas proteolíticas, hialuronidasa, fibrinolisina, lipasa, ribonucleasa y desoxiribonucleasa.

Ciertas cepas de *S. aureus* han sido descritas como las responsables del síndrome de shock tóxico (TSS), una seria manifestación de la infección por estafilococos caracterizada por fiebre alta, erupciones cutáneas, vómitos, diarrea y ocasionalmente la muerte. El shock tóxico se vio por primera vez en mujeres con menstruación asociado al uso de tampones. En mujeres con menstruación, la sangre y el mucus de la vagina puede ser colonizado por *S. aureus* hemolíticos provenientes de la piel; la presencia del tampón concentra el material que puede ser sustrato para el crecimiento de la bacteria, creando unas condiciones ideales para el crecimiento del microorganismo. Gracias a la modificación de los materiales empleados en la construcción de los tampones así como a la educación, el shock tóxico debido a los tampones es actualmente muy raro. No obstante el síndrome de shock tóxico es aún frecuente, tanto en hombres como en mujeres, como resultado de infecciones por estafilococos después de una operación de cirugía.

Los síntomas del TSS son el resultado indirecto de una exotoxina llamada *toxina del síndrome de shock tóxico (TSST)*. TSST es un superantígeno (*véase* Sección 22.14). La toxina del shock tóxico es liberada por los estafilococos, causando una masiva reacción de las células T que da lugar a la respuesta inflamatoria típica de las reacciones frente a los superantígenos. Una reacción similar a la TSS puede ser también determinada por diferentes superantígenos y *bacterias*, incluyendo *Streptococcus pyogenes* (*véase* Sección 29.4).

La enterotoxina A de los estafilococos es también un superantígeno y determina una forma de envenenamiento alimenticio. Presumiblemente, después de ingerir alimentos contaminados con la toxina, ésta estimula la respuesta de las células T, producción de intermediarios y aumento en la permeabilidad intestinal. El síntoma final es una severa pero corta diarrea y vómitos (*véase* Sección 29.4).

Tratamiento y prevención

El extensivo uso de los antibióticos ha tenido como consecuencia en la selección natural de cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Infecciones hospitalarias (nosocomiales) con estafilococos resistentes a antibióticos ocurren a menudo en pacientes cuya resistencia se encuentra disminuida debido a otras enfermedades, procesos quirúrgicos, o terapias con medicamentos (Sección 25.7). Los pacientes, a menudo, son contagiados por el personal del hospital que es portador asintomático de cepas resistentes a antibióticos. Por todo ello las terapias con antibióticos para las infecciones con *S. aureus* son problemáticas. Aunque algunas infecciones son tratables con penicilina, aislados de *S. aureus* productores de enfermedades deben ser individualemente testados para saber su sensibilidad a los distintos antibióticos (Sección 24.3).

La prevención de las infecciones por estafilococos es también problemática ya que muchos individuos son portadores asintomáticos, y algunas enfermedades, como el acné, se pueden contagiar por el simple contacto con dedos infectados. En ambientes hospitalarios tales como quirófanos o guarderías los portadores de cepas patógenas conocidas deben ser excluidos o tratados con antimicrobianos tópicos o sistémicos para erradicar el estado de portador.

✓ 26.9 Revisión de conceptos

Auque los estafilococos son habitantes inocuos de los tractos respiratorios superiores y de la piel, pueden producir diversas enfermedades serias, incluyendo aquellas causadas por las toxinas de los estafilococos que funcionan a modo de superantígenos.

- ✓ ¿Cuál es el hábitat normal de *S. aureus*? ¿Cómo se contagia *S. aureus* de persona a persona?
- ✓ Enumere las enfermedades causadas por la infección con estafilococos.

26.10 *Helicobacter pylori* y las úlceras gástricas

Helicobacter pylori fue identificado a partir de biopsias intestinales humanas en 1983. Este organismo es un patógeno asociado con gastritis, úlceras y cánceres gástricos.

Biología

Helicobacter pylori es un bacteria con forma espiral, Gram negativa, muy móvil y relacionada con *Campylobacter* (*véase* Sección 29.8). Mide de 2,5 a 3,5 μm de largo y de 0,5 a 1,0 μm de diámetro y tiene entre uno y seis flagelos polares en un extremo. *H. pylori* coloniza las mucosas no secretoras de ácido del estomago y de la parte alta del tracto intestinal, incluyendo el duodeno (*véase* Sección 21.4).

Epidemiología

Más del 80% de los pacientes con úlcera gástrica están además infectados por *H. pylori* y más del 50% de adultos asintomáticos en países desarrollados están infectados de forma crónica. El modo de transmisión no ha sido del todo definido, pero existen evidencias que sugieren una transmisión persona a persona y por ingesta de comida o agua contaminada. Aunque no se conoce un reservorio animal para

H. pylori, este organismo ha sido aislado a partir de gatos mantenidos como mascotas indicando que ha podido ser esparcido desde o hasta los animales por el contacto cercano con los humanos. Hay determinadas familias con un alto índice de miembros infectados, y la incidencia total aumenta con la edad. Estos factores indican una transmisión hospedador-hospedador (*véanse* Secciones 25.3, 25.4 y 25.5). No obstante infecciones con *H. pylori* a veces aparecen como epidemias sugiriendo un origen común como puede ser la comida o el agua.

Estudios epidemiológicos indican que las gastritis crónicas debidas a infecciones por *H. pylori* no tratadas pueden determinar la aparición de cánceres gástricos.

Patología

Helicobacter pylori es moderadamente invasivo, coloniza la superficid de la mucosa gástrica. El microorganismo se protege de los efectos de los ácidos estomacales gracias a la propia capa de mucus gástrico. Después de la colonización una combinación entre la producción de sustancias patógenas y la propia respuesta del hospedador produce inflamación, destrucción de tejido y ulceración. Los productos patógenos tales como *vacA* (una citotoxina; *véase* Tabla 21.4), ureasa y lipopolisacárido pueden contribuir a la destrucción localizada de tejido y a la ulceración. Anticuerpos frente a *H. pylori* están habitualmente presentes en individuos afectados, pero no son protectivos y no previenen la colonización. Individuos que adquieren *H. pylori* tienden a tener infecciones crónicas a no ser que sean tratados con antibióticos.

Diagnóstico

El diagnóstico definitivo necesita del aislamiento, cultivo y observación de *Helicobcter pylori* de una biopsia de úlcera. Anticuerpos séricos indican la infección por *H. pylori*, pero dado que las infecciones suelen ser crónicas y los anticuerpos pueden persistir durante meses después de una infección (*véase* Sección 24.7), los anticuerpos frente a *H. pylori* no son indicadores fiables de enfermedad activa y aguda.

Tratamiento

Pruebas de la asociación causal entre *Helicobacter pylori* y muchas úlceras gástricas vienen de los tratamientos de la enfermedad con antibióticos. Tratamientos a largo plazo con preparaciones antiácidas han dado éxito, aunque la mayoría de los pacientes ha recaído en el siguiente año. Sin embargo el tratamiento de las úlceras como una enfermedad infecciosa, ha hecho posible la cura permanente de la misma.

El tratamiento de las infecciones de *H. pylori* habitualmente consiste en una combinación de fármacos que incluye metranidazol, un segundo antibiótico como la tetraciclina o la amoxicilina y una preparación antiácida que contenga bismuto. El tratamiento combinado, mantenido durante 14 días, elimina la infección de *H. pylori* y determina una curación duradera de las úlceras.

Aunque la relación causal entre la infección por *H. pylori* y las úlceras no ha sido inequívocamente establecida, existen evidencias que acusan a *H. pylori* como el principal agente causante de la mayoría de las úlceras gástricas.

✓ 26.10 Revisión de conceptos

Las infecciones por *Helicobater pylori* aparecen cómo la más común causa de la úlceras gástricas. El tratamiento de las úlceras gástricas actualmente incluye antibióticos, los cuales parecen determinar la curación permanente.

- ✓ Describa la infección por *H. pylori* y cómo ésta determina la aparición de una úlcera.
- ✓ ¿Cómo se pueden curar de forma permanente las úlceras producidas por *H. pylori*?
- ✓ Describa las evidencias que indican que las infecciones producidas por *H. pylori* se transmiten de persona a persona.

26.11 Virus que producen hepatitis

La hepatitis es una inflamación del hígado comúnmente causada por un agente infeccioso. La hepatitis puede dar lugar a una patología aguda que determine la destrucción de la funcionalidad del hígado, condición conocida como **cirrosis**. La hepatitis debida a una causa infecciosa puede causar enfermedad aguda o crónica y algunas formas pueden llegar a determinar cáncer de hígado. Aunque muchos virus y algunas bacterias pueden causar hepatitis, solamente un grupo reducido de virus es el que más frecuentemente determina esta patología hepática.

Biología y epidemiología

Los virus que producen hepatitis son un grupo muy diverso. En la Tabla 26.1 se muestran los cinco virus conocidos causantes de hepatitis. Ninguno de estos virus está relacionado con los otros, pero todos infectan células del hígado causando diferentes formas de hepatitis.

Tabla 26.1 Virus que producen hepatitis

Enfermedad	Virus y genoma	Vacuna	Enfermedad	Vía
Hepatitis A	*Hepatovirus* (HAV) RNAmc polaridad positiva	Sí	Aguda	Entérica
Hepatitis B	*Orthohepadnavirus* (HBV) DNAbc	Sí	Aguda, crónica, oncogénica	Parenteral, sexual
Hepatitis C	*Hepacivirus* (HCV) RNAmc polaridad positiva	No	Crónica, oncogénica	Parenteral
Hepatitis D	*Deltavirus* (HDV) RNAmc polaridad negativa	No	Fulminante, sólo con HBV	Parenteral
Hepatitis E	Familia Calciviridae (HEV) RNAmc polaridad positiva	No	Enfermedad fulminante en embarazadas	Entérica
Hepatitis G	Familia Flaviviridae (HGV) RNmc polaridad positiva	No	Asintomática	Parenteral

El virus de la hepatitis A (HAV) se transmite de persona a persona, o por ingesta de comida o agua que ha estado en contacto con restos fecales infectados. El virus frecuentemente produce infecciones suaves, incluso de carácter subclínico y raramente aparecen casos de daño severo del hígado. Los transmisores más importantes de la hepatitis A son los bivalvos, generalmente ostras y almejas almacenadas con agua contaminada con restos fecales humanos. Aunque la evolución en el número de casos de HAV esta disminuyendo (Figura 26.24), parcialmente debido a la disponibilidad de una vacuna efectiva, hubo más de 17 000 casos de infecciones y 114 muertes atribuidas al HAV en 1999 en los Estados Unidos. HAV produce más casos de hepatitis vírica que cualquier otro de los virus.

La infección debida al virus de la hepatitis B (HBV) se conoce a menudo como hepatitis sérica. En la Figura 26.25 se muestra una partícula completa del virus (DNA de doble cadena) llamada partícula Dane. HBV causa una patología aguda y a menudo severa, que puede determinar el fallo hepático y la muerte. La infección crónica con HBV puede producir cirrosis y cáncer de hígado. El HBV se transmite generalmente por vía parenteral: transfusiones de sangre o agujas infectadas con sangre contaminada. El HBV también se puede transmitir por el intercambio de fluidos corporales, como es el caso de los contactos sexuales. El número de nuevos casos de infección por HBV está disminuyendo, de nuevo debido a la existencia de una vacuna efectiva, pero en 1999 hubo casi 8000 nuevos casos de HBV y más de 1000 muertes en los Estados Unidos.

El virus de la hepatitis D (HDV) es un *virus defectivo* que carece de genes para su propia cápsida. HDV se transmite también por la vía parenteral, pero como es un virus defectivo, no puede replicarse ni expresarse como un virus completo a no ser que la célula se halle también infectada con el virus HBV: el HDV genoma se replica y usa la proteína de la capsida del HBV para encapsidarse. Así pues las infecciones con HDV son siempre concomitantes con las infecciones con HBV.

El virus de la hepatitis C (HCV) también se transmite parenteralmente. HCV normalmente produce, en primera instancia, una enfermedad ligera o asintomática que evoluciona a hepatitis crónica en más del 85% de los individuos infectados, y más de un 20% desarrollan enfermedades hepáticas crónicas y cirrosis. La enfermedad crónica determina la aparición de hepatocarcinomas en el 3-5% de los infectados cada año. El periodo de latencia para la aparición de un cáncer puede ser de varias décadas desde la infección primaria. En 1999 hubo alrededor de 2500 nuevos casos de HCV en los Estados Unidos y, prácticamente, se producen tantas muertes a causa del HCV como casos de infecciones que devienen en cánceres de hígado. La enfermedades hepáticas producidas por el HCV son las afecciones hepáticas más comunes y dan cuenta del 40% de las 25 000 muertes debidas a enfermedades hepáticas y cirrosis en los Estados Unidos.

El virus de la hepatitis E (HEV) se transmite a través de la vía entérica. El HEV produce una aguda, auto-limitante hepatitis que varía en severidad dependiendo de los casos, pero es la causa de afección fulminante en mujeres embarazadas. HEV es endémico de Méjico y de las regiones tropicales y subtropicales de África y Asia.

El virus de la hepatitis G (HGV) se encuentra habitualmente en la sangre de pacientes con otro tipo de hepatitis aguda, y el HGV por sí solo, únicamente es capaz de causar infecciones muy ligeras o es completamente asintomático. El 8,1% de voluntarios donantes de sangre fueron positivos frente al HGV, pero la significación de este resultado no es clara ya que el HGV no se puede asociar con ninguna manifestación clínica.

Patología

La hepatitis es una enfermedad aguda del hígado. Los síntomas incluyen fiebre, ictericia (producción y liberación de grandes cantidades de bilirrubina por el hígado debido a la destrucción de los hepatocitos y dando lugar a un amarilleamiento de la piel y los ojos), *hepatomegalia* (agrandamiento del hígado) y cirrosis (destrucción de la

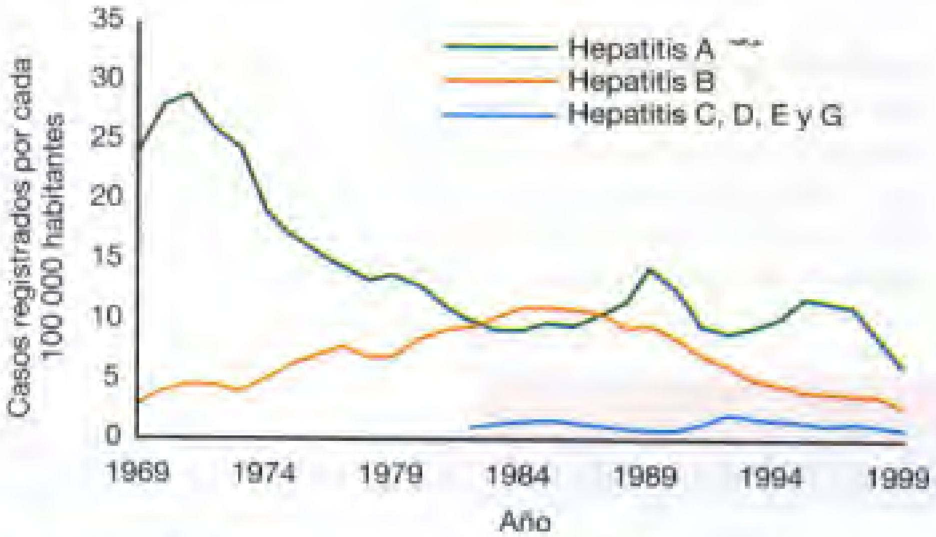
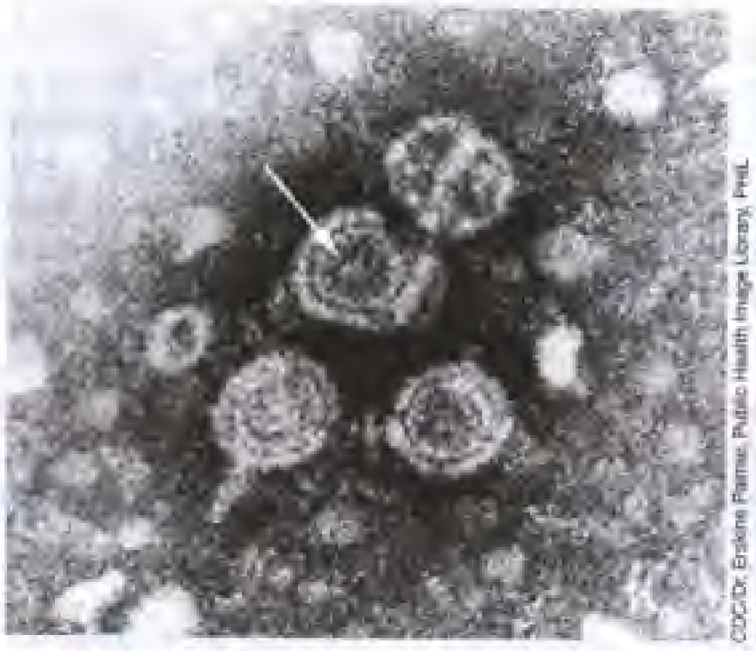


Figura 26.24 Hepatitis en los Estados Unidos. La incidencia de la hepatitis es mostrada por los agentes víricos. En 1999 hubo 17 047 casos de hepatitis A; 7694 casos de hepatitis B; y 3222 casos de otras hepatitis, la mayoría causadas por HCV. Los datos fueron obtenidos por los Centros de Control y Prevención de Enfermedades, Atlanta, GA, EE.UU.



CDC/Dr. Erskine Palmer; Public Health Image Library, PHIL

Figura 26.25 Virus de la hepatitis B (HBV). Las flechas indican la partícula completa del HBV, el cual tiene alrededor de 42 nm de diámetro y es conocido como la partícula Dane.

arquitectura normal del hígado y fibrosis). Episodios de hepatitis ligera puede caracterizarse por un relativo incremento de las enzimas hepáticas tales como alaninaaminotransferasa (ALT). Los casos fulminantes de la enfermedad se caracterizan por la aparición rápida de síntomas severos como ictericia y cirrosis, y es a menudo una condición que compromete la vida. Los distintos virus que producen la hepatitis causan similares manifestaciones clínicas y no pueden ser diferenciados por este aspecto. Las infecciones hepáticas crónicas, habitualmente causadas por HBV o HCV, a menudo son asintomáticas o causan una ligera sintomatología pero pueden causar enfermedades hepáticas serias, incluso sin contar con el *hepatocarcinoma* (cáncer de hígado).

Diagnóstico

El diagnóstico de la hepatitis se basa primeramente en los síntomas clínicos y en las pruebas de laboratorio que determinan la funcionalidad del hígado. La cirrosis se diagnostica por examen visual o por estudio de biopsias del hígado.

Existen también numerosos ensayos específicos de cada virus para confirmar el diagnóstico, identificación del agente infeccioso y determinación de un tratamiento apropiado. El cultivo directo de los virus que producen hepatitis no se usa con fines identificativos, HCV y HGV no han podido ser mantenidos en cultivo.

Algunos de los métodos más ampliamente empleados para determinar el tipo de hepatitis son inmunoensayos con enzimas unidas (ELA) (Sección 24.11). La mayoría de las pruebas ELA han sido diseñadas para identificar las proteínas víricas en la sangre de pacientes. También existen tests para indicar la presencia de anticuerpos IgM o IgG frente al HBV. La IgM se asocia con la respuesta primaria frente a la infección por HBV, e IgG se asocia con la respuesta secundaria frente a HBV. Además la identificación de la clase del anticuerpo puede indicar si se está, o no, ante una infección primaria por HBV (IgM) o si la respuesta es frente a una infección crónica o latente (IgG) (*véase* Sección 22.9). Otras pruebas basadas en tests inmunológicos utilizados para la detección de virus de la hepatitis incluyen inmunoblots (*véase* Sección 24.9) e inmunofluorescencia (*véase* Sección 24.10).

Las pruebas basadas en PCR o hibridación DNA-DNA del tipo *dot-blot* (*véase* Sección 24.13) también se emplean para la detección del genoma vírico en la sangre o en el tejido hepático obtenido a través de una biopsia (*véase* Sección 24.13).

Prevención y tratamiento

La infección con HAV o HBV puede prevenirse gracias a la existencia de vacunas efectivas. La vacunación frente a HBV se recomienda y en muchos casos es requerida para niños en edad escolar en los Estados Unidos (Sección 22.11). No se dispone de vacunas efectivas para el resto de virus productores de hepatitis.

«Precauciones Universales» para prevenir las infecciones transmitidas por la sangre están recogidas por las leyes y están destinadas a la protección frente al HBV y el virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (HIV) (Sección 24.4). Estos estándares ordenan precauciones para el personal que maneja residuos o fluidos corporales infectados y han sido diseñados para prevenir todas las hepatitis transmitidas por vía parenteral (HBV,HCV, HDV y HGV). Las precauciones indican un elevado nivel de vigilancia y procedimientos asépticos cuando se trata con pacientes, fluidos corporales o deshechos potencialente infectados.

Debido a que la hepatitis A se puede contagiar debido a la contaminación de fuentes comunes de alimentos y agua, grandes brotes epidémicos de hepatitis A se pueden evitar conservando las fuentes de alimentos y agua libres de estos patógenos (*véanse* Capítulo 28 y Capítulo 29).

El tratamiento post-exposición de la hepatitis es algunas veces exitoso. Inmunoglobulinas humanas pueden usarse para prevenir la infección por HAV si son administrados después de la exposición. Para prevención post-exposición de la infección por HBV, inmunoglobulinas específicas frente a la hepatitis B junto con la administración de la vacuna, han demostrado ser efectivas (*véase* Sección 22.11).

A pesar de que la mayoría de los tratamientos frente a la hepatitis son conservadores, es decir, proporcionan descanso y tiempo al hígado dañado para reparase, algunos fármacos antivíricos son efectivos (*véase* Sección 20.10). Interferón α es efectivo frente a HCV cuando se administra en combinación con ribavirina en algunos pacientes. HBV puede tratarse con foscarnet, ribavirina, lamivudina o ganciclovir.

✓ 26.11 Revisión de conceptos

Las hepatitis causadas por virus pueden producir enfermedades hepáticas muy serias. Hay vacunas disponibles frente al virus de la hepatitis A y B. La incidencia de la hepatitis ha disminuido de forma significativa en los últimos 20 años en los Estados Unidos, pero la hepatitis vírica es todavía una importante enfermedad infecciosa y un gran problema de salud pública debido a gran capacidad infectiva de los virus.

- ✓ Describa el modo de transmisión de la hepatitis A, B y C.
- ✓ Describa los métodos para la prevención y tratamiento de la hepatitis A y B.

III ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL

Diferentes patógenos humanos de gran importancia se transmiten, casi exclusivamente, por contacto sexual. Las enfermedades causadas por estos patógenos se conocen como enfermedades de transmisión sexual, ETSs.

Las ETSs o *enfermedades venéreas* son causadas por una amplia variedad de bacterias, virus, protozoos e incluso hongos (Tabla 26.2). A diferencia de los patógenos respiratorios que son constantemente, y en grandes cantidades, esparcidos por el aire por los individuos infectados; los pa-

Tabla 26.2 Enfermedades de transmisión sexual y tratamiento recomendado

Enfermedad	Organismo causante[a]	Tratamiento recomendado[b]
Gonorrea	*Neisseria gonorrhoeae* (B)	Cefixima o ceftriaxona, y azitromicina o doxiciclina
Sífilis	*Treponema pallidum*	Benzatina y penicillina G
Infecciones por *Chlamydia trachomatis*	*Chlamydia trachomatis* (B)	Doxiciclina o azitromicina
Uretritis no gonocócica	*C. trachomatis* (B) *Ureaplasma urealyticum* (B) *Micoplasma genitalium* (B) *Tricomonas vaginalis* (P)	Azitromicina
Lipogranuloma venéreo	*C. trachomatis* (B)	Doxiciclina
Chancroide	Haemophilus ducreyi (B)	Azitromicina
Herpes genital	Herpes simples tipo 2 (V)	Sin cura conocida, los síntomas pueden ser controlados con la aplicación tópica de aciclovir (Figura 26.32)
Verrugas genitales	Virus del papiloma (algunas especies)	Sin cura conocida, verrugas asintomáticas pueden ser eliminadas quirúrgica o químicamente, o por crioterapia
Tricomoniasis	*Tricomonas vaginalis* (P)	Metronidazol
SIDA	Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)	Sin cura conocida, análogos a nucleótidos, inhibidores de proteasas, inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa (*véase* Tabla 26.3)
Enfermedad inflamatoria pélvica	*N. gonorrhoeae* (B) o *C. trachomatis* (B)	Cefotefan
Candidiasis vulvovaginal	*Candida albicans* (H)	Butoconazol

[a] B, bacterias; V, virus; P, protozoos; H, hongos.

[b] Recomendaciones del Departamento de Salud y Servicios Humanos, Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos. Para muchos de los medicamentes existe un aceptable número de alternativas.

tógenos de transmisión sexual se encuentran solo generalmente en los fluidos sanguíneos que se intercambian durante la actividad sexual. Esto es así porque estos patógenos son muy sensibles a la desecación y a otras condiciones ambientales tales como el calor o la luz. Su hábitat, el tracto genitourinario humano, es un medio protegido y con la humedad necesaria. Por todo ello estos organismos colonizan preferentemente, y en algunos casos exclusivamente, el tracto genitourinario.

El diagnóstico y tratamiento efectivos de las ETSs se ve muy dificultado por razones sociales y biológicas. Primero, más de un tercio de las ETSs son padecidas por jóvenes con múltiples parejas; es difícil definir y detener las fuentes y la distribución de la enfermedad. Segundo, muchas ETSs manifiestan síntomas menores y los individuos infectados no buscan tratamiento. Tercero, estigmas sociales alrededor de las ESTs hacen que muchos individuos no busquen rápidamente un tratamiento para su infección. Sin embargo un rápido y efectivo tratamiento para las ETSs es deseable por una serie de razones. Primera, la mayoría de las ETSs se curan y prácticamente todas se pueden controlar con el tratamiento médico apropiado. Segunda, el retraso o la ausencia de tratamiento puede producir problemas a largo plazo como infertilidad, cáncer, enfermedades del corazón, enfermedades nerviosas degenerativas, defectos en el feto o muerte del mismo.

Debido a que la transmisión de las ETSs se limita a un contacto físico íntimo, generalmente durante el curso de una relación sexual, la expansión de las enfermedades venéreas se puede controlar mediante la abstinencia sexual (ausencia de intercambio de fluidos corporales) o por el uso de barreras tales como los preservativos que evitan dicho intercambio de fluidos durante las relaciones sexuales.

Las ETSs siguen siendo muy comunes y generando grandes problemas tanto médicos como sociales. Vamos a centrarnos en este apartado en la discusión de algunas de las ETSs de mayor incidencia.

26.12 Gonorrea y sífilis

Tanto la gonorrea como la sífilis son ETSs bacterianas prevenibles y tratables. Debido a sus diferencias en los síntomas, la incidencia de ambas es bastante diferente. La gonorrea presenta una alta incidencia y sus síntomas son, a menudo, muy suaves o inaparentes, especialmente en las mujeres. Como resultado el padecimiento de la enfermedad muchas veces no es conocido y por ello no es tratada. La sífilis, sin embargo, actualmente presenta baja incidencia. Esto es así, en parte, por que la sífilis habitualmente exhibe síntomas muy obvios y los individuos infectados buscan tratamiento (Figura 26.26).

Gonorrea

Neisseria gonorrhoeae, a menudo conocida como gonococo, causa la gonorrea. *N. gonorrhoeae* es un diplococo, Gram negativo, no esporulado, aerobio estricto, oxidasa positivo y encapsulado (*véase* Sección 12.10) relacionado bioquímica y filogenéticamente con *Neisseria meningitidis* (*véase* Sección 26.6). *N. gonorrhoeae* es muy sensible a la desecación y normalmente no es capaz de sobrevivir fuera de las membranas mucosas del tracto genitourinario (Figura 26.27). Los gonococos son rápidamente eliminados por desecación, luz solar y luz ultravioleta.

Debido a su extrema sensibilidad a las condiciones ambientales, *N. gonorrhoeae* únicamente puede transmitirse por

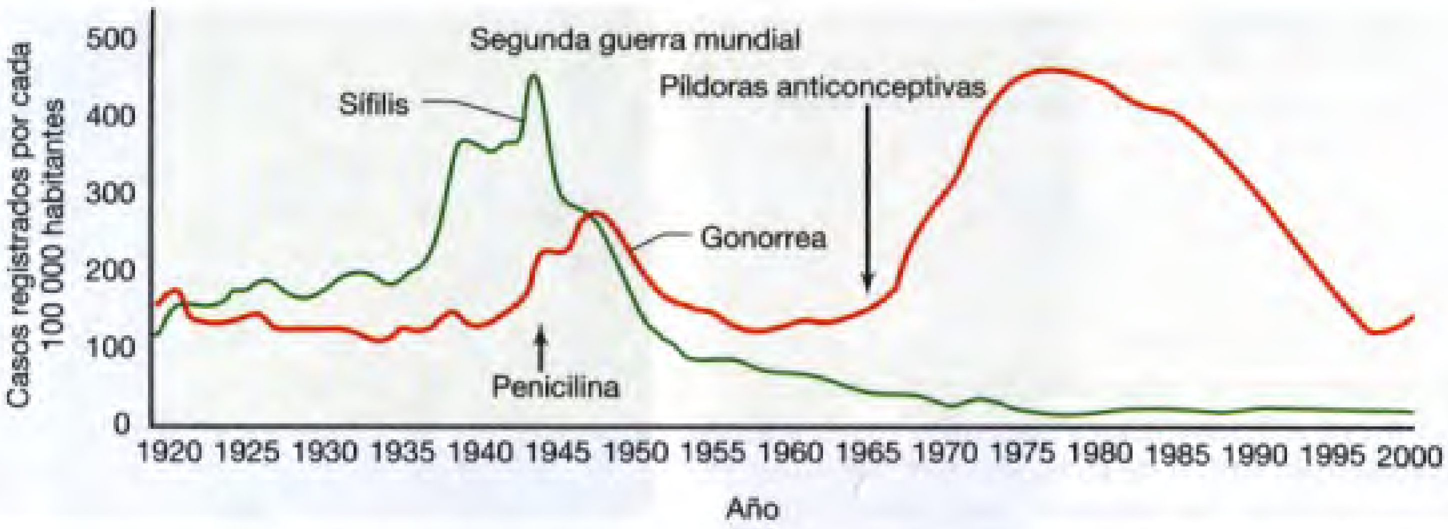


Figura 26.26 Casos registrados de gonorrea y sífilis (sólo casos primarios y secundarios) por cada 100 000 habitantes en los Estados Unidos. Nótese la tendencia a disminuir después de la introducción de los antibióticos y la tendencia a aumentar la gonorrea después de la introducción de las píldoras anticonceptivas. En 1999 hubo más de 360 000 casos de gonorrea y solo alrededor de 6600 casos de sífilis.

contacto íntimo persona a persona. El patógeno entra en el cuerpo a través de las membranas mucosas del tracto genitourinario.

Los síntomas de la gonorrea son bastante diferentes en el hombre y en la mujer. La gonorrea femenina se caracteriza por una ligera vaginitis difícil de diferenciar de las vaginitis producidas por otros organismos, y la infección puede fácilmente pasar inadvertida; en el hombre, sin embargo, el microorganismo causa una dolorosa infección de la uretra (Figura 21.11). Complicaciones producidas por una gonorrea no tratada incluyen la enfermedad pélvica inflamatoria y daño de las válvulas del corazón y tejidos conjuntivos.

Además de gonorrea, este microorganismo también causa infecciones en los recién nacidos. Niños nacidos de madres infectadas pueden adquirir infecciones en los ojos durante el nacimiento. Por ello, generalmente se administra a los recién nacidos eritromicina para prevenir la infección. Ya se discutió la microbiología clínica y la diagnosis de la gonorrea en la Sección 24.1.

El tratamiento de la gonorrea con penicilina ha sido muy efectivo en el pasado; sin embargo cepas de *N. go-*

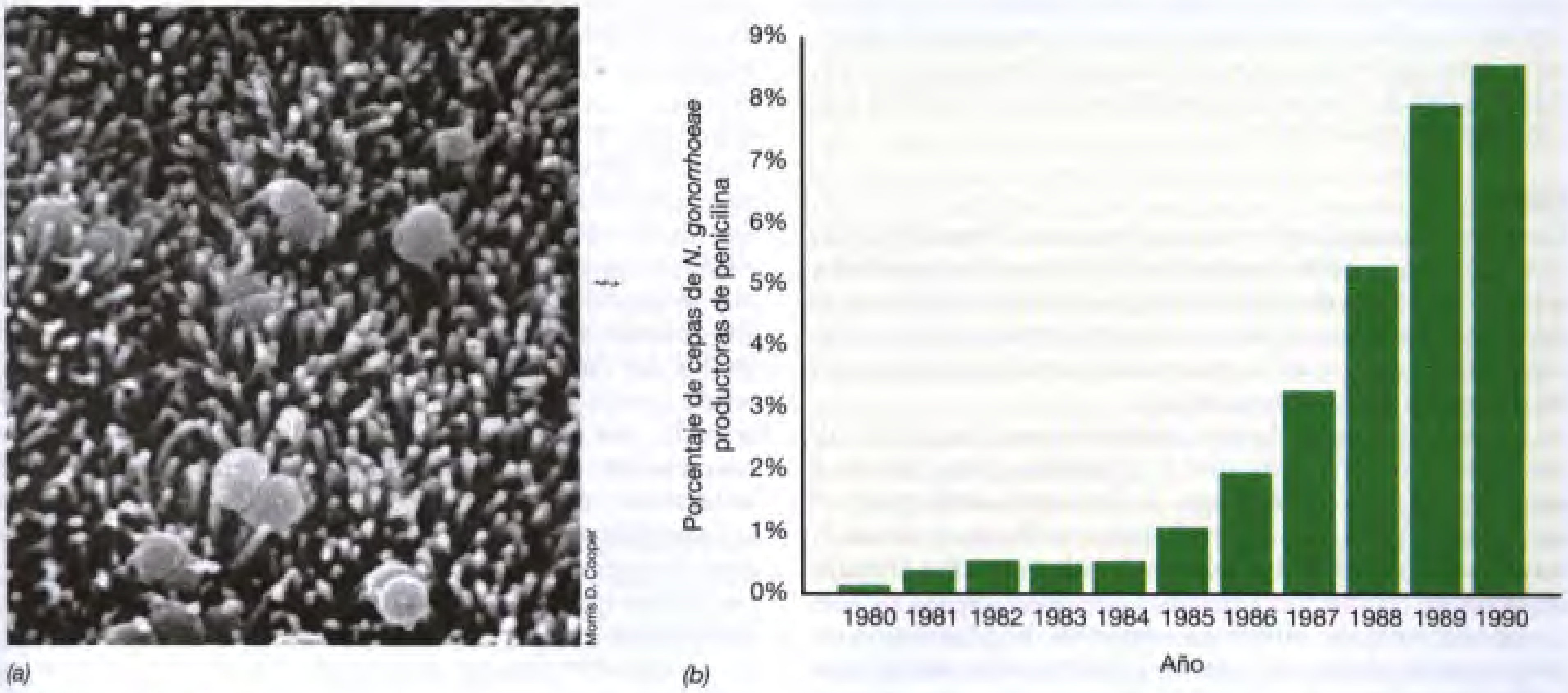


Figura 26.27 El agente etiológico de la gonorrea, *Neisseria gonorrhoeae*, y la incidencia en la producción de penicilinasa en este organismo. (a) Micrografía de barrido de las microvellosidades de la mucosa de la trompa de Falopio; se muestra como las células de *N. gonorrhoeae* se unen a la superficie de las células epiteliales. Nótese la diferente morfología de los diplococos. Las células de *N. gonorrhoeae* miden alrededor de 0,8 µm de diámetro. (b) Casos recogidos de *N. gonorrhoeae* productoras de penicilinasa (PPNG) en los Estados Unidos. Nótese el rápido aumento en la resistencia. Como resultado, la penicilina no se usa como tratamiento de la gonorrea (*véase* Tabla 26.2 para los actuales tratamientos).

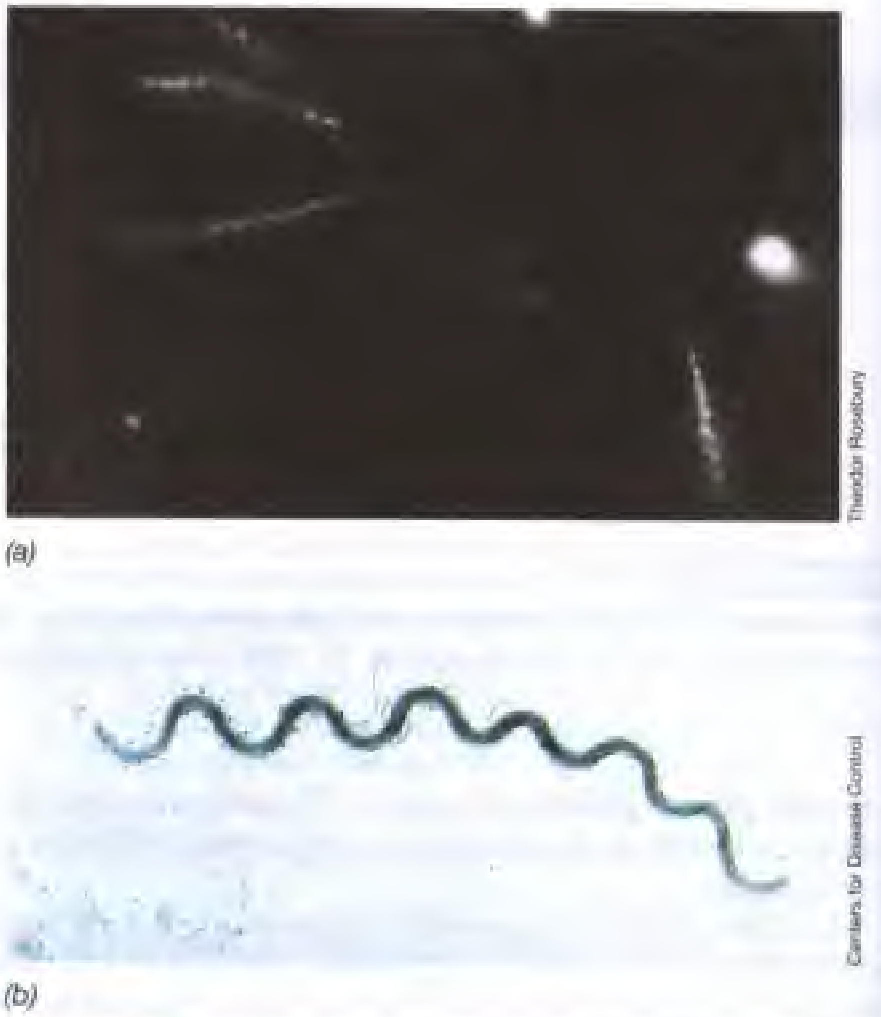
norrhoeae resistentes a penicilina aparecieron durante los años 70 (Figura 26.27b), y actualmente están ampliamente extendidas. Esta resistencia es debida a la presencia de un plásmido que codifica a la penicilinasa. En los Estados Unidos más del 8% de los aislados clínicos son cepas productoras de penicilinasa. Afortunadamente la mayoría de las cepas productoras de penicilinasa responden a terapias con antibióticos alternativos, con una sola dosis de cefixima o ceftrixona. Azitromicina o doxiciclina son administradas habitualmente al mismo tiempo ya que son agentes efectivos frente a las infecciones por *Chlamydia trachomatis*, organismo muy difícil de diagnosticar pero que aparece asociado al 50% de los casos de gonorrea (Tabla 26.2).

A pesar de la facilidad con que se puede curar la gonorrea, la incidencia de la infección por gonococos se mantiene relativamente alta. Las razones son triples. (1) No existe inmunidad adquirida; por tanto es posible la reinfección (no se sabe si esto es debido a la ausencia de inmunidad local o a que se conocen al menos 16 diferentes serotipos de *N. gonorrhoeae*). (2) El uso de contraceptivos orales altera el ambiente de la mucosa a favor del patógeno. Los anticonceptivos orales hacen que el cuerpo mimetice un estado de embarazo, lo que resulta, entro otras cosas, en la ausencia en la producción de glicógeno por la vagina y un aumento en pH de la misma. En la vagina de adultos normalmente se encuentran bacterias lácticas (Sección 21.5) las cuales bajo estas circustancias son incapaces de producir ácido láctico lo cual facilita la colonización de *N. gonorrhoeae* desde un individuo infectado. (3) Los síntomas en la mujer son tan ligeros que la enfermedad puede pasar inadvertida, y una mujer infectada promiscua puede servir como reservorio para la infección de muchos hombres. La enfermedad puede ser controlada si las personas que han mantenido contactos sexuales con personas infectadas son rápidamente identificadas y tratadas, pero a menudo es difícil obtener esta información y más difícil aún concretar un tratamiento.

Sífilis

La sífilis es causada por una espiroqueta, *Treponema pallidum*. *T. pallidum* mide alrededor de 10-15 μm de longitud y entorno a 0,15 μm de diámetro (Figura 26.28). *T. Pallidum* es extremadamente sensible al stress ambiental como la desecación, calor o luz y es normalmente transmitido de persona a persona por contacto sexual.

La sífilis transmitida por contacto sexual es potencialmente mucho más seria que la gonorrea, pero debido a sus diferencias en patobiología, la incidencia de la sífilis en los Estados Unidos se ha reducido mucho más desde la introducción de una terapia antibiótica efectiva (Figura 26.26).



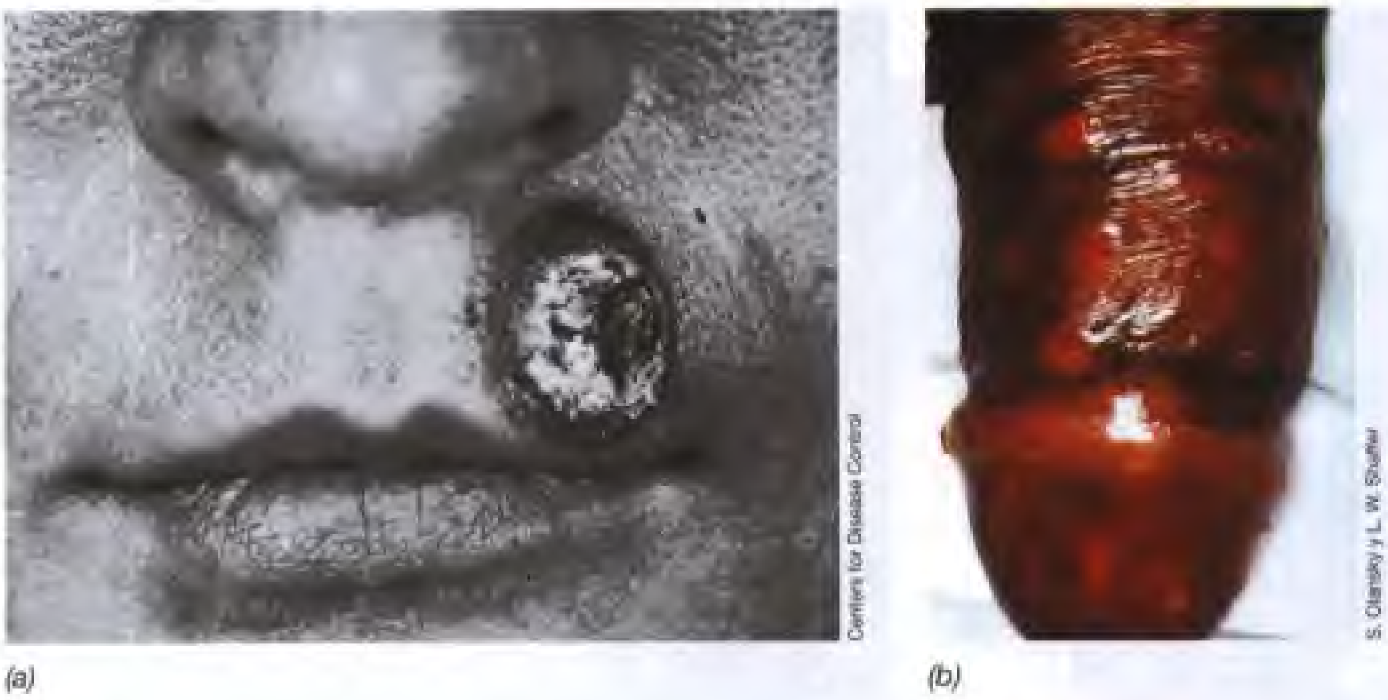
Theodor Rosebury

Centers for Disease Control

Figura 26.28 Espiroquetas de la sífilis, *T. pallidum*. (a) Microscopía de campo oscuro de un exudado. Las células de *T. pallidum* miden 0,15 µm de ancho y 10-15 µm de largo. (b) Micrografía electrónica de una célula de *T. Pallidum*. Nótese los endoflagelos (filamentos axiales) típicos de las espiroquetas (véase Sección 25.3).

La sífilis exhibe síntomas variables. El organismo no pasa a través de la piel intacta, y la infección inicial probablemente tiene lugar a través de pequeñas roturas en la capa epidérmica. En los hombres, la infección inicial es habitualmente en el pene; en las mujeres es más frecuente en la vagina, cuello del útero o región perineal. En alrededor del 10% de los casos la infección es extragenital, habitualmente en la región oral. Durante el embarazo, el microorganismo se puede transmitir de la madre infectada al feto; la enfermedad así adquirida por un niño se llama sífilis congénita. *T. pallidum* se multiplica en el sitio inicial de entrada y las lesiones características que produce, entre 2 semanas y 2 meses) se las conoce con el nombre de *chancro duro* (Figura 26.29). La microscopía de campo oscuro de un exudado de chancro, a menudo revela las espiroquetas moviéndose (Figura 26.28a). En la mayoría de los casos el chancro se cura espontáneamente y el microorganismo abandona esa zona. Algunas células, sin embargo, se esparcen desde el sitio inicial de la infección a distintas partes del cuerpo tales como membranas mucosas, ojos, tejido conectivo, huesos o el sistema nervioso central ocurriendo una extensión multiplicación. A menudo ocurre una reacción de hipersensiblilidad frente al treponema que determina una erupción en la piel; el cual es síntoma de la infección secundaria. En este momento el paciente es muy infeccioso, pero el microorganismo suele desaparecer de las lesiones secundarias y la capacidad infectiva desaparece.

El siguiente estadio de la enfermedad cuando no se ha tratado es muy variable. Alrededor del 25% de los individuos infectados parecen curarse como demuestra la bajada en el título de anticuerpos, otro 25% no vuelve a mostrar síntoma alguno aunque persiste una demostrable infección, sugerido por el aumentado título de sus anticuerpos. En alrededor de la mitad de los pacientes la enfermedad entra



Centers for Disease Control

S. Olansky y L. W. Shaffer

Figura 26.29 Lesiones primarias de la sífilis. (a) Chancro en un labio. (b) Varios chancros en un pene.

en una tercera fase, con síntomas que van desde relativamente ligeran infecciones de la piel y los huesos, hasta infecciones muy serias o fatales del sistema cardiovascular o nervioso central. La fase más seria de la enfermedad es cuando afecta al sistema nervioso central ya que puede producir una parálisis generalizada u otros severos daños neurológicos. En la fase terciaria hay muy pocos microorganismos y la mayoría de los síntomas puede deberse a una hipersensiblidad retardada (*véanse* Secciones 22.7 y 22.13) frente a las espiroquetas.

Ya explicamos la inmunología clínica y la microbiología así como la diagnosis de este organismo en la Sección 24.1. El signo más importante de infección primaria, el chancro, es también una prueba diagnóstica de la enfermedad. Las personas infectadas generalmente buscan tratamiento para la sífilis debido a lo visible de estas lesiones.

La penicilina es muy efectiva en la terapia frente a la sífilis, y tanto las fases primara como secundaria de la infección se pueden controlar con una única dosis de benzatina penicilina G. En sífilis terciarias, el tratamiento con penicilina debe mantenerse durante más tiempo. La incidencia de sífilis primaria y secundaria ha disminuido significativamente en los Estados Unidos durante las dos últimas décadas y se encuentra actualmente en sus niveles más bajos.

✓ 26.12 Revisión de conceptos

La gonorrea y la sífilis, causadas por *Neisseria gonorrhoene* y *treponema pallidum* respectivamente, son ETSs con consecuencias potencialmente serias si no son convenientemente tratadas. La incidencia es aún de más de 300 000 casos de gonorrea y 6000 casos de sífilis anuales en los Estados Unidos.

- ✓ Dé al menos una razón potencial de la alta incidencia de la gonorrea en comparación con la sífilis.
- ✓ Describa los tratamientos tanto para la gonorrea como para la sífilis. ¿Pueden estos tratamientos llegar a curar la enfermedad?

26.13 *Chlamydia*, herpes y tricomoniasis

Chlamydia, herpes y tricomoniasis son importantes ETSs producidas por una bacteria, un virus y un protozoo. Estas enfermedades tienen una elevada incidencia en la población y son mucho más difíciles de diagnosticar y tratar que la sífilis y la gonorrea.

Chlamydia

Actualmente es una enfermedad reseñable (Tabla 25.4), un hospedador de síndromes transmitidos sexualmente puede ser adscrito a las infecciones por la bacteria intracelular obligada *Chlamydia trachomatis* (Figura 26.30 y Sección 12.28). La incidencia total de infecciones por *C. trachomatis* transmitidas por vía sexual probablemente supere con creces a los casos de gonorrea. Pueden existir más de 3 millones de casos nuevas de infecciones por *C. trachomatis* cada año, haciendo de este organismo el que presenta una mayor incidencia dentro de las enfermedades venéreas. *C. trachomatis* también causa una grave enfermedad en el ojo conocida como *trachoma* (Sección 12.28) pero las cepas de *C. trachomatis* responsables de las infecciones venéreas son diferentes de las que causan las infecciones en los ojos. Las infecciones por *C. trachomatis* pueden también transmitirse congénitamente al recién nacido causando conjuntivitis y neumonía. Por último, la infecciones por *C. trachomatis* están implicadas en el desarrollo de placas en las arterias y enfermedades coronarias.

La *Uretritis chlamidial no gonocócica* (NGU) es una de las enfermedades de transmisión sexual mas frecuentemente observadas hoy en día. *C. trachomatis* causa uretritis en hombres y uretritis, cervicitis y enfermedad pélvica inflamatoria en mujeres. Tanto en hombres como en mujeres, son comunes las infecciones asintomáticas. En una pequeña proporción de casos, NGU producidos por *C. trachomatis* pueden desencadenar serias infecciones agudas, incluyendo inflamación testicular y de la próstata en hombres, y daños en las trompas de Falopio en mujeres; las células de *C. trachomatis* se unen a las células de las microvellosidades de las trompas de Falopio, entrando en ellas, donde se multiplican y

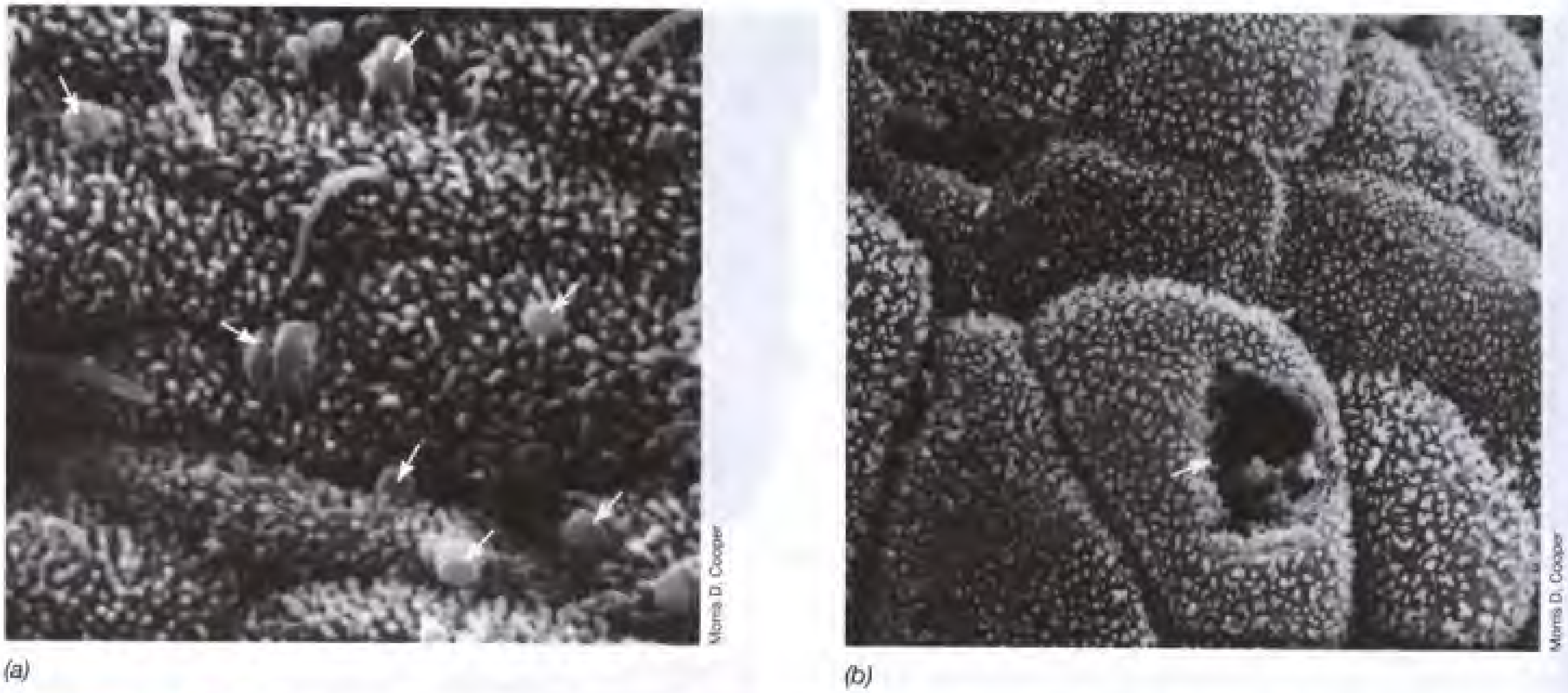


Figura 26.30 Células de *Chlamydia trachomatis* (flechas) unidas a los tejidos de la trompa de Falopio humana. (a) Células unidas a las microvellosidades de la trompa de Falopio. (b) Trompa de Falopio dañada conteniendo una célula de *C. trachomatis* (flecha) en la lesión.

eventualmente las lisan (Figura 26.30). Infecciones no tratadas pueden dar lugar a infertilidad.

NGU debido a *C. trachomatis* es relativamente difícil de diagnosticar por los métodos tradicionales de aislamiento e identificación. Actualmente se usan una variedad de métodos inmunológicos para detectar a *C. trachomatis* a partir de un frotis vaginal o pélvico o de los fluidos de dichas áreas. Entre estas pruebas se incluyen anticuerpos monoclonales fluorescentes y varios ensayos del tipo ELISA para detectar la presencia de antígenos de esta bacteria. Cuando se sospecha una infección por *C. trachomatis*, se inicia un tratamiento con azitromicina o doxiciclina. La penicilina no es efectiva frente a *C. trachomatis* porque carece de peptidoglicano, la diana de las penicilinas (*véanse* Sección 12.28 y Tabla 26.2).

Las NGU debidas a *Chlamydia* son encontradas frecuentemente como una infección secundaria asociada a la gonorrea. Si ambos, *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* son transmitidas por un mismo portador en un solo evento, el tratamiento de la gonorrea con cefixima o ceftriaxona es exitoso pero no elimina a Chlamydia. Aunque curados de la gonorrea, estos pacientes están aun infectados con Chlamydia y eventualmente parece que sufren recurrencias de gonorrea pero se trata de casos de NGU de chlamydia. Por tanto las recomendaciones actuales son que además de tratar la gonorrea se le proporcione al paciente azitromicina o doxiciclina para tratar la posible coexistencia, habitualmente no diagnosticada, de la infección por *C. trachomatis*.

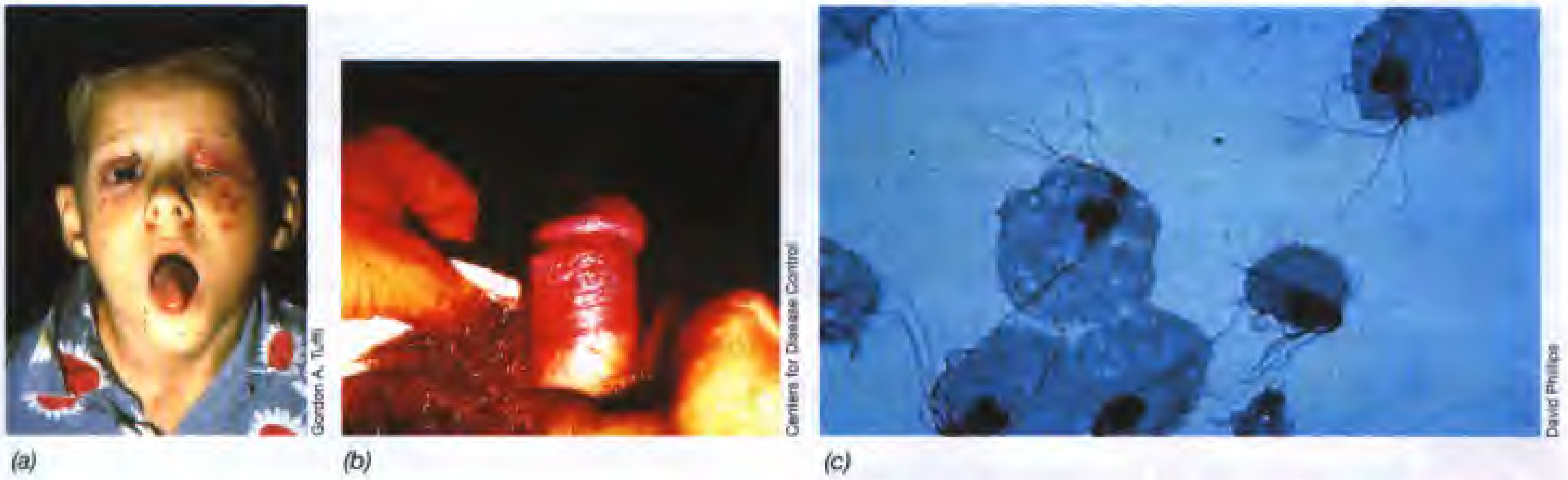
El *linfogranuloma venéreo* es también una enfermedad de transmisión sexual causada por distintas *C. trachomatis*. La enfermedad, que afecta principalmente a hombres, consiste en una hinchazón de los nódulos linfáticos en y alrededor de la ingle. Desde los nódulos infectados las células de Chlamydia pueden viajar hasta el recto causando una dolorosa inflamación de los tejidos del recto llamada *proctitis*. Debido a las potenciales complicaciones, al daño de los nódulos linfáticos locales y a la proctitis, el linfogranuloma venéreo es considerado como uno de los más serios síndromes de transmisión sexual determinados por *C. trachomatis*.

Herpes

Los herpesvirus son grupo amplio del complejo grupo de los virus con DNA de doble cadena (*véase* Sección 16.11), muchos de los cuales son patógenos humanos. Un subgrupo de los herpesvirus, los *virus del herpes simple* son los responsables de las infecciones genitales y los herpes labiales.

El virus del Herpes simple de tipo I (HSV-1) infecta a las células epiteliales principalmente alrededor de la boca y los labios, causando calenturas y ampollas (Figura 26.31). HSV-1 se distribuye vía contacto directo o a través de la saliva. HSV-1 puede, no obstante, ocasionalmente infectar otras áreas del cuerpo incluyendo las regiones ano-genitales. El periodo de incubación es corto (3 a 5 días) y las lesiones desaparecen sin tratamiento en 2 a 3 semanas. Reapariciones de HSV-1 son relativamente comunes, y se piensa que el virus se distribuye primariamente por el contacto con las lesiones infecciosas. Infecciones latentes de herpes son aparentemente muy comunes en las cuales el virus persiste en bajo número en los tejidos nerviosos. Recurrencias en los brotes de infección por herpes son debidos a periódicos desencadenamientos de la actividad del virus por causas desconocidas.

Las infecciones del *virus del herpes simple* 2 (HSV-2) se asocian primeramente con las zonas ano-genitales, donde el virus causa dolorosas ampollas en el pene de los hombres



Gordon A. Tuffi

Centers for Disease Control

David Phillips

Figura 26.31 Patógenos no bacterianos transmitidos sexualmente: herpesvirus y *Tricomonas*. (a) Un caso severo de ampollas de herpes en la cara debido a la infección con un virus del herpes simple de tipo 1. (b) Herpes genital debido a la infección del pene con virus del herpes de tipo 2. (c) Células de protozoo flagelado *Trichimonas vaginalis*.

o en el útero, vulva o vagina de las mujeres (Figura 26.31b). Las infecciones por HSV2 se transmiten por contacto sexual directo siendo más fácil el contagio cuando las ampollas son aparentes más que en los momentos en que éstas no aparecen (presumiblemente estados de latencia). HSV2 ocasionalmente infecta otras partes del cuerpo tales como la membranas mucosas de la boca.

Los efectos a largo plazo de los herpes genitales no se conocen aun. Los herpes orales son muy comunes y aparentemente no tienen efectos en el hospedador más allá de las ampollas orales. Sin embargo estudios epidemiológicos han demostrado una significante relación entre el herpes genital y cáncer de útero en mujeres. Además HSV-2 se puede transmitir al recién nacido en el momento del nacimiento por contacto con las lesiones del virus. La enfermedad en los recién nacidos varía desde infecciones latentes sin aparente daño hasta infecciones sistémicas que pueden desencadenar daño cerebral y la muerte. Para evitar el contagio del herpes a los recién nacidos se recomienda la cesárea en mujeres que padezcan infecciones de este tipo.

Las infecciones genitales por herpes son actualmente incurables, aunque un limitado número de fármacos han sido satisfactorios en el control de las fases de aparición de ampollas. El análogo de la guanina aciclovir (Figura 26.32), suministrado por vía oral o aplicado por vía tópica, es particularmente efectivo limitando el esparcimiento de los virus activos de las ampollas promoviendo la rápida curación de las mismas. El aciclovir específicamente interfiere con la DNA polimerasa de los herpesvirus, inhibiendo la replicación del DNA vírico.

Tricomoniasis

La uretritis no gonocócica puede ser también producida por la infección por el protozoo *Trichomonas vaginalis* (Figura 26.31c) Aunque mucho protozoos producen células quiescentes llamadas *quistes*, *T. vaginalis* no los produce. La transmisión es de persona a persona, generalmente por contacto sexual. Las células de *T. vaginalis* pueden vivir unas pocas horas fuera del cuerpo humano siempre que no sufran desecación, por tanto la transmisión de *T. vaginalis* por contacto con asientos del lavabo, bancos de las saunas, y toallas ocurre ocasionalmente. *T. vaginalis* infecta la vagina en mujeres y la próstata y vesículas seminales en los hombres, y la uretra tanto en hombres como en mujeres.

Muchos casos de tricomoniasis son totalmente asintomáticos en hombres. En mujeres la tricomoniasis se caracteriza por emisiones vaginales, vaginitis y dolor al orinar. La infección es más común en mujeres; hay sondeos que indican que entre el 25-50% de las mujeres sexualmente activas se encuentran contagiadas, mientras que solo el 5% de los hombres lo están. En el compañero de una mujer infectada se debe examinar la presencia de *T. vaginalis* y ser tratada si fuera necesario ya que hombres promiscuos asintomáticos pueden servir como reservorios y transmitir la enfermedad a múltiples mujeres. La tricomoniasis se diagnostica mediante examen microscópico del fluido vaginal de una paciente, buscándose protozoos móviles (Figura 26.31c).El fármaco antiprotozoos *metronidazol* es particularmente efectivo en el tratamiento de la tricomoniasis (Tabla 26.2).

✓ 26.13 Revisión de conceptos

La clamidiais es una ETS causada por la infección con la bacteria *Chlamydia trachomatis*. Clamidiasis es la ETS con mayor incidencia. Las lesiones del herpes pueden tambien transmitirse sexualmente y son causadas por el virus del herpes simple de

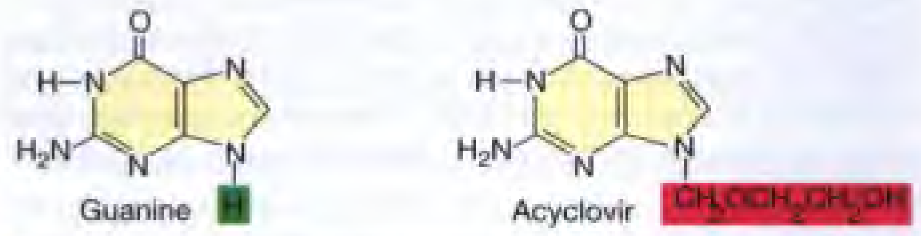


Figura 26.32 Estructura de la guanina y del aciclovir, análogo de la misma. El aciclovir se usa para controlar las ampollas producidas por el virus del herpes de tipo 2 (HSV2).

tipo 1 y tipo 2. HSV-2 esta generalmente asociado con transmisión sexual e infecciones en el área ano-genital si bien HSV-1 también puede causar lesiones en esta zona. *Tricomonas vaginalis* es un protozoo responsable de la tricomoniasis, otra ETS. En general las ETSs están muy ampliamente extendidas y son más difíciles de diagnosticar y tratar que la gonorrea o la sífilis. No existe cura para el herpes.

✓ Describa los síntomas clínicos y el tratamiento frente a Chlamydia, herpes y tricomoniasis.

✓ ¿Por qué estas enfermedades son más difíciles de diagnosticar que la gonorrea o la sífilis?

26.14 Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA)

El síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) fue reconocido como enfermedad en 1981. Solo en los Estados Unidos se han registrado más de 600 000 casos desde entonces y más de 400 000 personas han muerto (Sección 25.6) Actualmente más de 900 000 personas pueden estar infectadas en los Estados Unidos con el HIV, el agente causante del SIDA. Alrededor de 16 millones de personas han muerto ya de SIDA.

El HIV se divide en dos tipos principales, HIV-1 y HIV-2. HIV-1 es genéticamente similar pero diferente al HIV-2. HIV-2 fue descubierto en el Oeste de África en 1985, presenta una virulencia reducida si se le compara con el HIV-1 pero también causa una enfermedad como el SIDA. Actualmente más del 99% de los casos mundiales de SIDA son debidos al HIV-1 y por ello nos vamos a centrar en este tipo.

El número de individuos infectados por HIV continuará aumentando dramáticamente si no se descubren efectivos métodos de tratamiento o prevención. Ya hemos discutido sobre la epidemiología del SIDA (*véanse* Secciones 25.8-25.10), y los métodos diagnósticos para la identificación de la infección por HIV (*véanse* Secciones 25.8-25.10). En esta sección vamos a concentrarnos en la patogénesis del SIDA.

El virus de la inmunodeficiencia humana

La enfermedad del SIDA es causada por el virus de la inmunodeficiencia humana. HIV-1 es un retrovirus (Sección 16.14) que contiene 9749 nucleóticos en cada uno de los dos genomas idénticos de RNA de cadena sencilla de que dispone. Gracias a la enzima *transcriptasa inversa* que se encuentra intacta en el virión, el HIV sintetiza una cadena de DNA complementaria usando el RNA como molde y convierte el DNA complementario sintetizado (cDNA) en DNA de doble cadena, el cual se puede introducir en el genoma del hospedador. Aquí vamos a considerar el curso natural de la infección por HIV y los efectos que éste tiene sobre el sistema inmunitario, determinando la aparición del SIDA.

Una definición de SIDA

El SIDA fue considerado sospechoso de ser una enfermedad que afecta al sistema inmunitario debido al gran número de infecciones oportunistas observadas en ciertas poblaciones (Sección 25.6). *Las infecciones oportunistas* se encuentran raramente en individuos con el sistema inmunitario normal. Esta definición fue adoptada en 1993 por los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (Atlanta, Georgia, EE.UU) y es empleada en los Estados Unidos para definir los casos de SIDA.

La definición actual del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) incluye a aquellos individuos que son positivos frente al virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) Y:

1. Tienen un número de células T CD4 menor que $200/mm^3$ en la sangre completa (el número normal es de 600-$1000/mm^3$), o porcentaje de células T CD4/linfocitos totales de menos del 14%; O.
2. Tener un número de células T CD4 mayor que $200/mm^3$ y alguna de las siguientes condiciones: enfermedades producidas por hongos incluyendo candidiasis (Figura 26.33a), coccidiomicosis, criptococosis (Figura 26.33b), histoplasmosis (Figura 26.33c), isosporiasis, neumonía producida por *Pneumocistis carinii* (Figura 26.33d), cristosporidiosis (Figura 26.33e) o toxoplasmosis (Figura 26.33f) del cerebro; enfermedades bacterianas incluyendo tuberculosis pulmonar y otras infecciones por *Mycobacterium spp.* (Figura 26.33g) o recurrentes septicemias por *Salmonella*; enfermedades víricas incluyendo infecciones por citomegalovirus, encefalopatías relacionadas con HIV, úlceras crónicas, o bronquitis debidas al herpes simple (*véase* Sección 16.11); o progresivas leucoencefalopatías multifocales, enfermedades malignas tales como cáncer invasivo de útero, sarcoma de Kaposi (Figura 26.34), linfoma de Burkitt, linfomas primarios en el cerebro, linfomas inmunoblásticos; neumonías recurrentes debidas a cualquier agente.

La más común de estas infecciones oportunista es la neumonía producida por *Pneumocistis carinii*. Otra enfermedad muy frecuente en enfermos de SIDA es el sarcoma de Kaposi, un atípico cáncer observado con alta frecuencia en hombres homosexuales infectados por el virus. El sarcoma de Kaposi es un cáncer de las células de los vasos sanguíneos y se caracteriza por la aparición de parches púrpuras en la superficie de la piel, especialmente en las extremidades (Figura 26.34). El sarcoma de Kaposi puede ser causado por una coinfección de HIV y el herpesvirus humano de tipo 8 (HHV-8) cuya presencia es 20 000 veces mayor que la población general.

En suma, un individuo tiene SIDA si (1) es positivo frente a HIV o anticuerpos frente a HIV; (2) tiene una drástica disminución en el número de linfocitos T colaboradores; o (3) tiene al menos una de las numerosas infecciones oportunistas o cánceres atípicos.

HIV: interacción con las células e infección

El HIV es capaz de infectar células que tengan en su superficie la proteína CD4. Existe una notable variedad de células que tienen esta molécula en su superficie en escasa proporción como son los linfocitos B, y ciertas células del cerebro y el intestino. Sin embargo los dos tipos celulares más

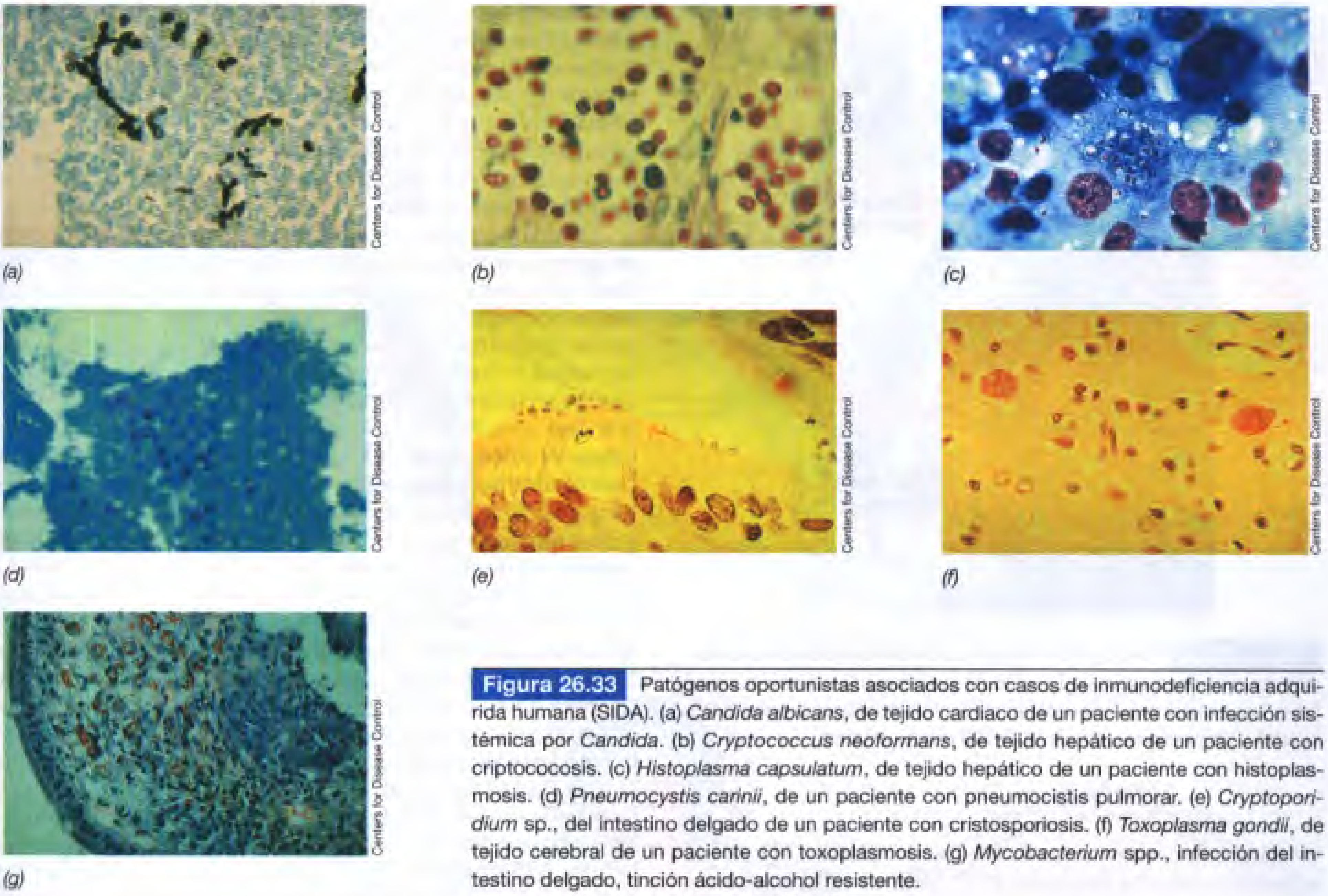


Figura 26.33 Patógenos oportunistas asociados con casos de inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA). (a) *Candida albicans*, de tejido cardiaco de un paciente con infección sistémica por *Candida*. (b) *Cryptococcus neoformans*, de tejido hepático de un paciente con criptococosis. (c) *Histoplasma capsulatum*, de tejido hepático de un paciente con histoplasmosis. (d) *Pneumocystis carinii*, de un paciente con pneumocistis pulmorar. (e) *Cryptoporidium* sp., del intestino delgado de un paciente con cristosporiosis. (f) *Toxoplasma gondii*, de tejido cerebral de un paciente con toxoplasmosis. (g) *Mycobacterium* spp., infección del intestino delgado, tinción ácido-alcohol resistente.

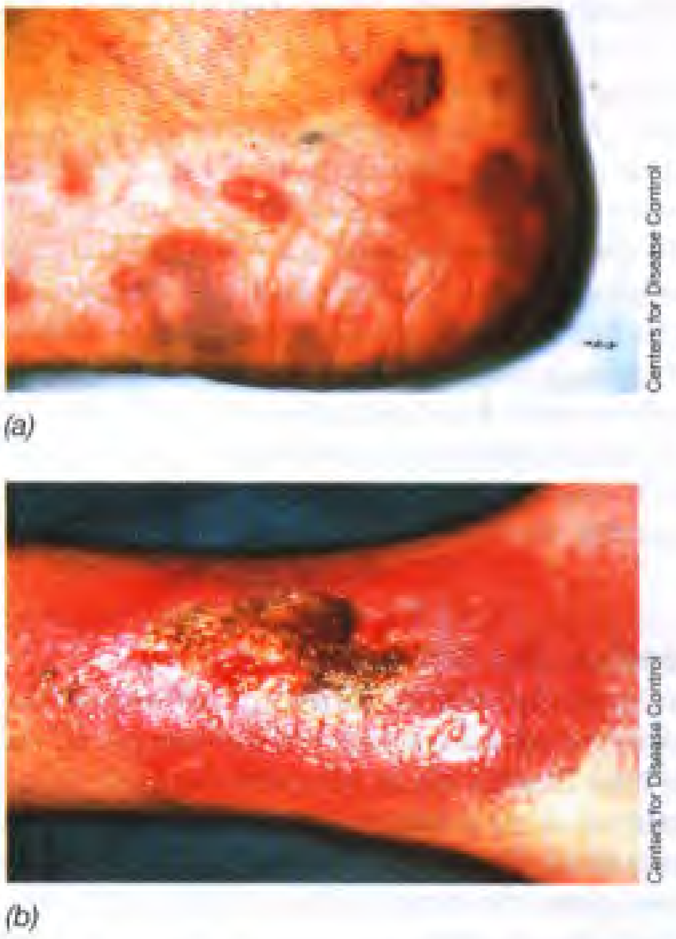


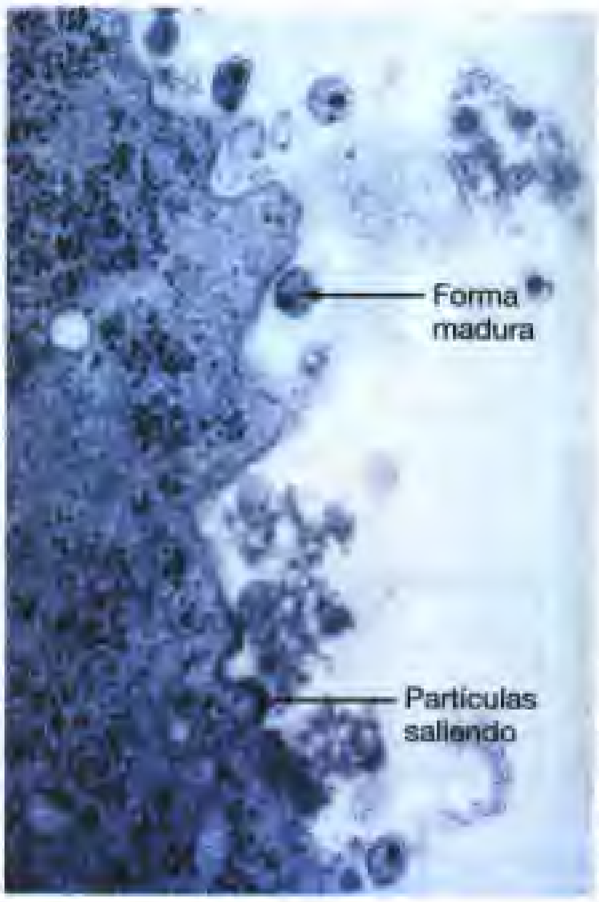
Figura 26.34 Lesión del sarcoma de Kaposy como aparece en (a) el talón y la parte lateral del pie, y (b) la parte distal de la pierna y el tobillo.

afectados por el virus son los macrófagos y los linfocitos T colaboradores, los cuales son piezas clave dentro del sistema inmunitario (*véanse* Secciones 22.1 y 22.7). Los macrófagos y linfocitos infectados liberan gran cantidad de virus los cuales infectan otras células que disponen de CD4 (Figura 26.35).

La infección del HIV ocurre normalmente primero en los macrófagos, un tipo de células presentadoras de antígeno (APC) con muy bajos niveles de CD4 en superficie (*véase* Sección 22.1) (Figura 26.36). En la superficie de la célula la molécula CD4 se une a la gp120 del virus, entonces gp120 interacciona con otra proteína del macrófago, el receptor de quimioquinas CCR5 (Sección 23.10). CCR5 actúa como correceptor para el HIV, y junto con CD4 forma el sitio de anclaje donde la envuelta del virus se fusiona con la membrana celular, permitiendo la inserción de la nucleocápsida.

El correceptor CCR5 es requerido para la unión del HIV a los macrófagos. Individuos que expresan una variante de la proteína CCR5 que no une el HIV no adquieren la infección por HIV.

Después de que el HIV ha infectado a los macrófagos, genera una forma distinta de gp120, la cual se une a un correceptor distinto, el receptor de quimioquinas CXCR4 que se encuentra en los linfocitos T. El HIV entra y destruye a los linfocitos T colaboradores, células responsables de las respuestas inflamatorias mediadas por células



Centers for Disease Control

Figura 26.35 Micrografía electrónica de transmisión de una sección de un linfocito liberando virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Las células provienen de un paciente hemofílico que desarrolló el SIDA. Las partículas son de 90 a 120 μm de diámetro.

y de las respuestas de los linfocitos B (células TH1 y TH2 respectivamente) (Sección 22.7). Así, el HIV comienza con una infección con tropismo por los macrófagos (tropismo M) y progresa a un tropismo por células T (tropismo T). El resultado neto de la infección por HIV es la destrucción sistémica de macrófagos y linfocitos T, determinando una catastrófica destrucción del sistema inmunitario. El conocimiento de los correceptores específicos implicados en la infección del HIV de los macrófagos y linfocitos T podría usarse para diseñar agentes bloqueantes de los correceptores que prevengan la unión del virus al macrófago y a la célula T, previniendo por tanto la infección.

En casos de estado clínico de SIDA, el número de linfocitos T CD4 se encuentra muy reducido. Sin embargo, el HIV no mata inmediatamente a las células del hospedador. Seguidamente a la transcripción inversa que produce DNA a partir del genoma de RNA, el cDNA vírico se integra en el genoma de la célula hospedadora donde existe en forma de provirus. La célula no muestra signo alguno de infección y el DNA del HIV puede estar en un estado de latencia durante largos periodos de tiempo. Sin embargo, también ocurre la síntesis de nuevos virus que salen de los linfocitos T. Las células T que producen partículas de HIV no se dividen y eventualmente mueren.

La destrucción acelerada de las células CD4 ocurre como consecuencia del procesamiento de los antígenos del virus por las células infectadas. Estas células insertan moléculas de gp120 de la partícula vírica en su superficie. La proteína gp120 embebida en la célula hospedador sujeta a células T no infectadas a través de la unión con CD4. Eventualmente, numerosas células de estas características se fusionan produciendo células gigantes multinucleadas llamadas *sincitios*. Una célula T infectada puede llegar a unir hasta 50 células T sin infectar. Rápidamente después de la formación de los sincitios las células pierden su funcionalidad inmunitaria y mueren.

En último término la infección por HIV produce un progresivo decaimiento en el número de linfocitos T CD4. Esto tiene serias consecuencias para la salud. En un individuo normal, las células CD4 constituyen el 70% del total de linfocitos; en pacientes con SIDA, el número de linfocitos T disminuye progresivamente hasta que aparecen infecciones oportunistas cuando las células CD4 están casi ausentes (*véanse* Figura 24.21 y Figura 26.37). Como el número de células T CD4 disminuye, hay una concomitante bajada en las citoquinas que producen determinando la gradual reducción de células T sin infectar y de todos los demás linfocitos lo que va deteriorando el sistema inmunitario en los individuos que sufren SIDA. La pérdida tanto de las funciones del sistema inmunitario humoral como celular se hace entonces aparente. Infecciones sistémicas por hongos y micobacterias (Figura 26.33) repuntan como consecuencia de la ausencia de la función Th1 o celular (Sección 22.7). Otras infecciones oportunistas, tales como diferentes infecciones víricas y bacterianas asociadas con el SIDA, indican la pérdida de la inmunidad humoral; la bajada en la producción de anticuerpos es debida a la pérdida de las células Th2 necesarias para estimular la producción de anticuerpos por las células B (Sección 22.7).

La imagen conjunta de la progresión del SIDA no tratado indica que durante el periodo de latencia clínica un proceso altamente infeccioso tiene lugar. Primero hay una intensa respuesta inmunitaria frente al HIV: alrededor de 1 billón de viriones son destruidos cada día y el número de virus disminuye drásticamente. Sin embargo, esto significa que el HIV se divide muy rápidamente lo que se corresponde con la destrucción de 100 millones de células T CD4 cada día. Eventualmente la respuesta inmunitaria es desbordada, el número de virus aumenta, y las células T son totalmente destruidas, mutilando la respuesta inmunitaria y permitiendo la aparición de infecciones oportunistas. El ejemplo de la Figura 26.37 documenta la destrucción de las células T y el incremento de HIV en un típico desarrollo de la infección.

Diagnóstico del SIDA

El diagnóstico del SIDA se basa en pruebas clínicas y de laboratorio, los elementos claves son ser positivo en el test de existencia de HIV en la sangre y la presencia o reciente padecimiento de una infección oportunista o cáncer atípico. La presencia de anticuerpos anti HIV en la sangre es el indicador usual de exposición al HIV e infección Secciones 24.11 y 24.12). Además, existen diferentes pruebas de laboratorio, basadas en *transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)* (Sección 18.5) que identifica el RNA del HIV directa y cuantitativamente de las mues-

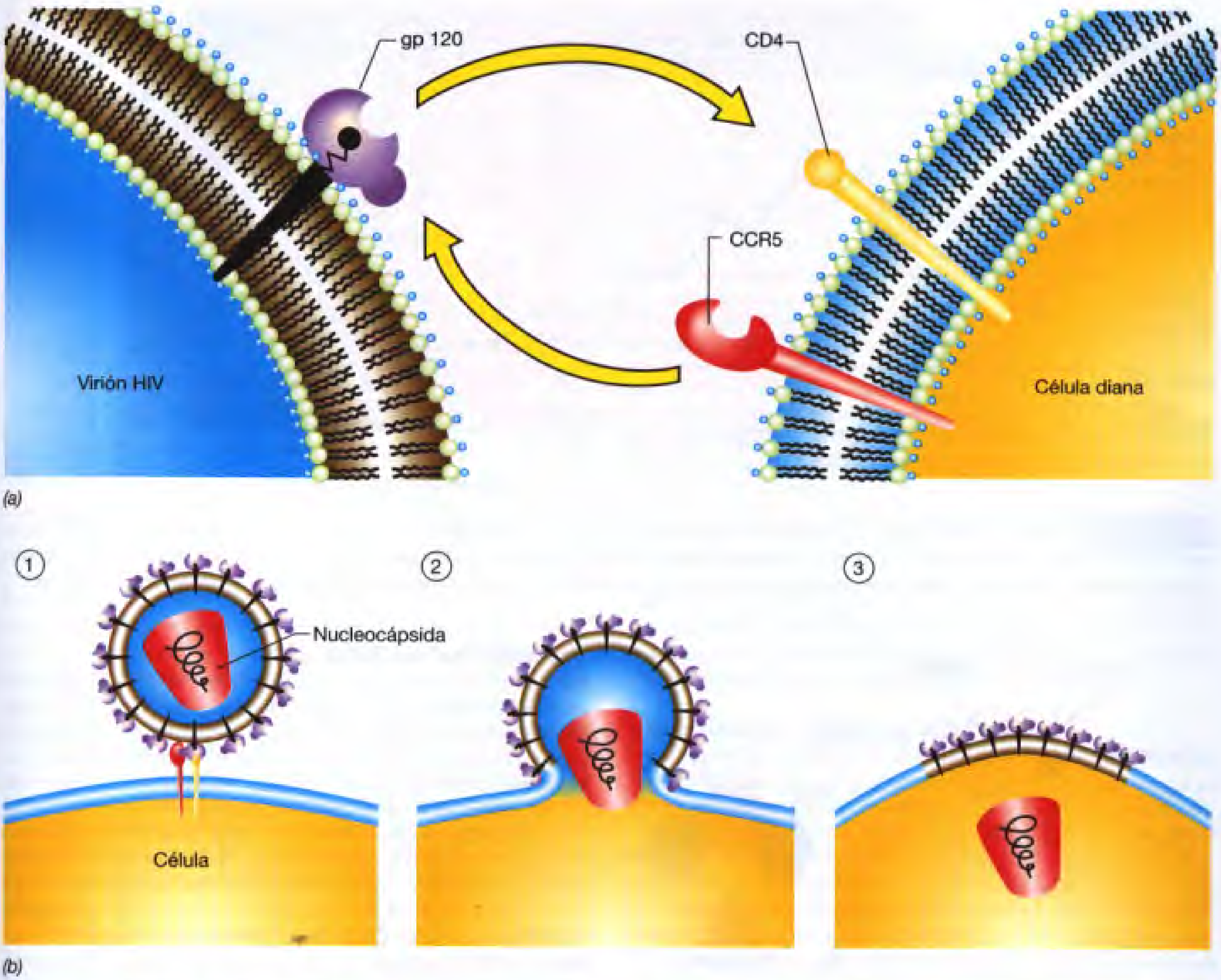


Figura 26.36 Infección de una célula CD4 diana con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). (a) Interacción con la célula diana a través de la unión específica de gp120 del virus con el receptor CD4 y un correceptor en células diana tales como macrófagos y células T CD4. El correceptor es el receptor de membrana para quimioquinas CCR5 que se encuentra en los macrófagos. Un correceptor similar, el CXCR4, se encuentra en los linfocitos T CD4. (b) Fusión de la envuelta del HIV con la membrana de la célula hospedador e inserción de la nucleocápsida. El sitio de entrada del virus es el sitio determinado por el receptor y el correceptor. El correceptor es necesario para la inserción vírica e infección, ya que células que no expresan dicho correceptor no resultan infectadas con HIV.

tras de sangre (Sección 24.13). La RT-PCR estima el número de virus presentes en la sangre, lo que se conoce como carga vírica. La RT-PCR indica la magnitud de la replicación del HIV y se puede correlacionar con la proporción de células T CD4 destruidas. La prueba de CD4 indica la extensión del daño en el sistema inmunitario determinado por la infección del HIV. La prueba de la RT-PCR no se usa de rutina para diagnosticar HIV ya que es costosa y técnicamente compleja. Después del descubrimiento inicial de la infección la RT-PCR se usa para seguir la evolución del SIDA y la eficacia de la terapia. (Figura 26.38, *véase* a continuación).

La prognosis de una infección por HIV no tratada no es esperanzadora. Patógenos oportunistas o cánceres (*véanse* Figuras 26.33 y 26.34) matan a la mayoría de los pacientes de SIDA. Estudios a largo plazo en pacientes con SIDA indican que en general las personas infectadas con HIV progresan a través de varias etapas de disminución de las funciones inmunitarias, con niveles de células T CD4 desde un intervalo normal 600-1000/mm^3 hasta prácticamente cero en un periodo de 5-7 años (Figura 26.37). Aunque el nivel de declive en la función inmunitaria varía entre los distintos individuos, es raro que un individuo HIV-positivo viva más de 10 años sin ningún tipo de intervención quimioterapeútica.

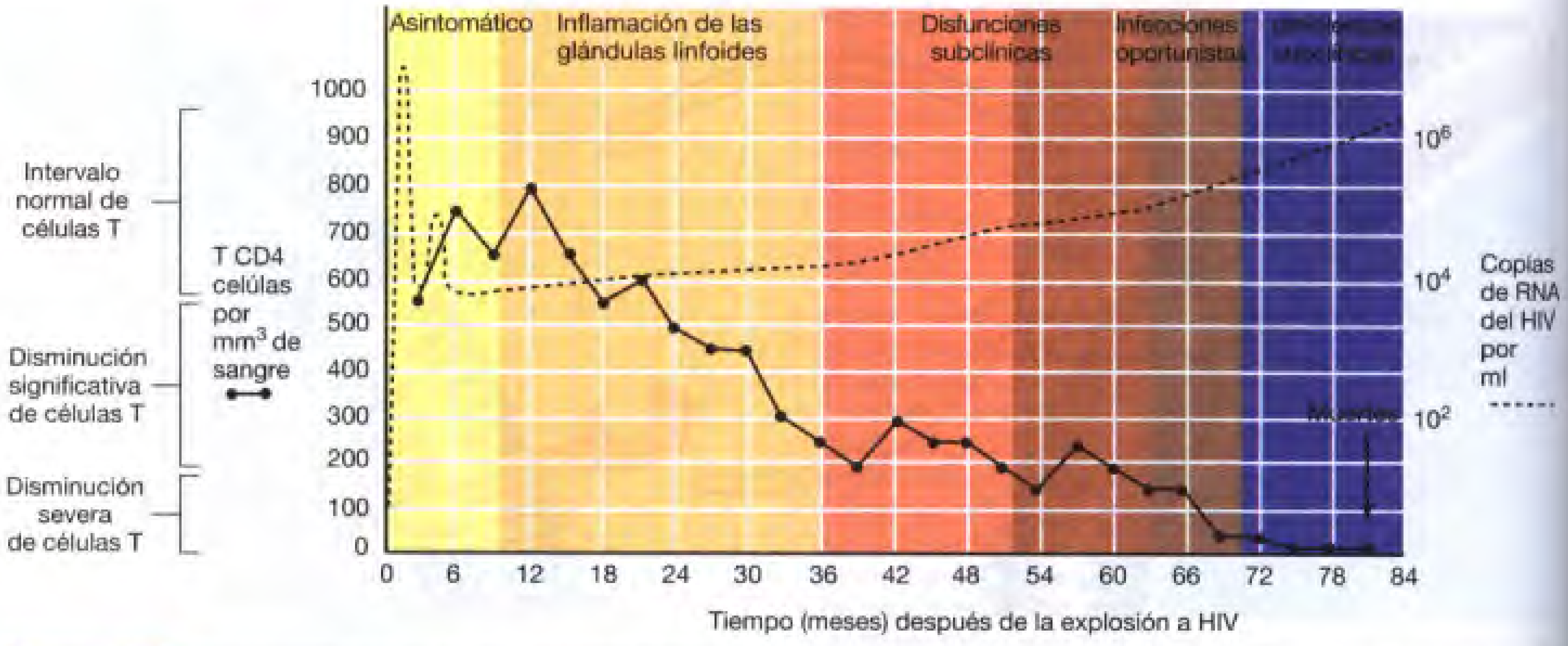


Figura 26.37 Descenso de linfocitos T CD4 y progreso de la infección por HIV, basado en el número de virus (carga vírica) en la sangre de un paciente típico no tratado (Sección 24.13). Durante la progresión típica del SIDA, existe una gradual pérdida en el número y funcionalidad de las células T CD4, mientras la carga vírica, medida como RNA específico del HIV por mililitro de sangre, aumenta gradualmente después del descenso inicial.

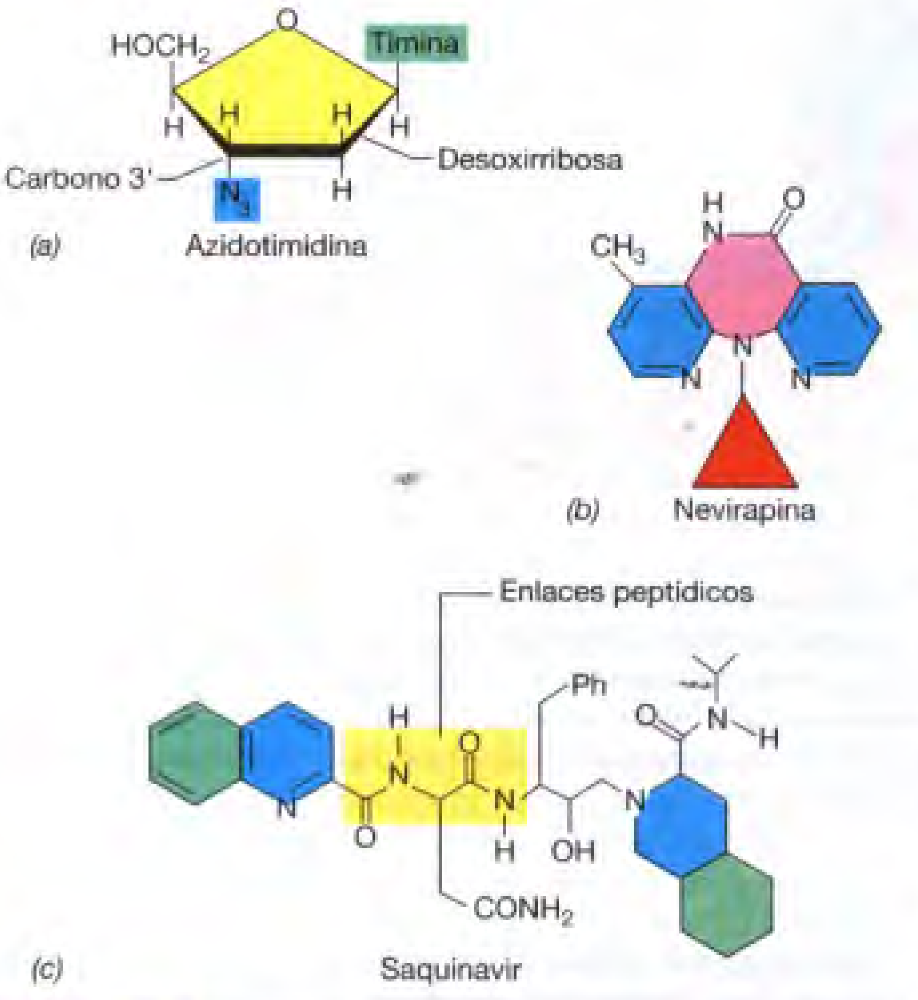


Figura 26.38 Ejemplos de las tres categorías de fármacos frente al HIV/SIDA. (a) Azidotimidina (AZT), análogo de un nucleósido. La ausencia de un grupo –OH en el carbono 3' produce que la elongación de la síntesis de DNA termine cuando se incorpora este análogo, inhibiendo la replicación vírica. (b) Nevirapina, un inhibidor no nucleósido de la transcriptasa inversa, se une directamente al sitio catalítico inhibiendo también la elongación de la cadena de DNA. (c) El saquinavir es un análogo al enlace peptídico, el área sombreada indica la región análoga a un enlace peptídico. El bloqueo de la actividad de la proteasa del VIH previene el procesamiento de las proteínas del HIV y la maduración del virus (Figura 20.27).

Tratamiento del SIDA

No se conoce cura para las infecciones por HIV. A pesar de que la investigación es muy intensa en las áreas de la producción de una vacuna y de la farmacología. Diferentes fármacos han sido identificados como retardadores de los síntomas del SIDA lo que en algunos casos prolonga la vida de los infectados por HIV (Tabla 26.3).

Los fármacos efectivos frente al HIV están dentro de tres categorías. La primera es el grupo de *los análogos de nucleósidos* que actúan como inhibidores de la *transcriptasa inversa*. La transcriptasa inversa es la enzima que convierte el RNA de cadena sencilla en el DNA complementario (Sección 16.14). El más antiguo y efectivo de los fármacos anti-HIV, la azidotimidina (AZT) es un efectivo inhibidor de la replicación del HIV debido a su gran parecido con el nucleósido timidina pero carece del sitio de unión para la base siguiente resultando en la terminación de la elongación de la cadena de DNA en que se introduce. Así, el AZT y otros análogos a nucleósidos son **nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa** (NRTIs), son efectivos en la detención de la replicación del virus (Figura 26.38a, Tabla 26.3). Cuando estos fármacos son administrados a pacientes infectados con HIV, el resultado es una rápida caída en la carga vírica. Sin embargo después de varias semanas, aparecen cepas del HIV resistentes a estos fármacos como resultado de procesos de mutación y selección en el virus. Este proceso es muy rápido, y es debido a que el HIV se replica muy rápidamente (*véase* más adelante) y tan solo cuatro mutaciones son suficientes para conferir la resistencia a un análogo de nucleósido dado.

La segunda categoría de fármacos anti-HIV son los **inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos** (NNRTIs) (*véanse* Figura 26.38*b*; Tabla 26.3). Estos compuestos inhiben directamente la actividad de la transcriptasa inversa por interacción con la proteína y alteración de

Tabla 26.3 Agentes quimioterapeúticos aprobados para el tratamiento del HIV/SIDA

Fármaco	Mecanismo de acción
Azidotimidina [AZT, ZDV o Zidovudina (Figura 26.38*a*)]	*Análogo de nucleósido*; inhibidor de la transcriptasa inversa, terminador de la síntesis de la cadena de nucleótidos; incrementa el tiempo de supervivencia y reduce la incidencia de infecciones oportunistas en pacientes con SIDA; tóxico para las células de la médula ósea; puede ser usada en combinación con otros fármacos en protocolos de múltiples compuestos
Dideoxicitidina (ddC o zalcitabina) Dideoxiinosina (ddI o didanosina) Stabudina (d4T) Lamivudina (3TC)	*Análogos de nucleósidos*; inhibidores de la transcriptasa inversa; mecanismo de acción y efectos idénticos al AZT; pueden tener menos toxicidad que el AZT en algunos pacientes; pueden usarse en combinación con otros fármacos en protocolos de múltiples compuestos
Efavirenz Nevirapina (Figura 26.38*b*) Delavirdina	*Inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosidicos (NNRTIs)*; se unen directamente a la transcriptasa inversa e inutilizan el sitio activo; no compiten con los nucleósidos; pueden ser usados en combinación con otros compuestos en protocolos de terapia combinada
Indinavir Nelfinavir Ritonavir Saquinavir (Figura 26.38*c*)	*Inhibidores de la proteasa*; análogos al enlace peptídico diseñados por ordenador que se unen al sitio activo de la proteasa del HIV, inhibiendo el procesamiento de las proteínas víricas; puede usarse en combinación con otros fármacos en protocolos de terapia combinada

la conformación del centro activo. Desafortunadamente, una sola mutación en el gen de la transcriptasa inversa es suficiente para reducir la efectividad de este fármaco. La última categoría de fármacos anti-HIV son los inhibidores de la proteasa (Figura 26.38c; Tabla 26.3). Los inhibidores de la proteasa son análogos al enlace peptídico diseñados por ordenador que se unen al sitio activo de la proteasa del HIV, inhibiendo el procesamiento de los polipétidos del virus (Sección 20.13); inhibiendo de este modo la maduración vírica. Sin embargo, al igual que ocurre con las otras estrategias quimioterapeúticas, una sola mutación en el gen de la proteasa del HIV es suficiente para que este fármaco no sea efectivo.

Debido a los problemas de resistencias frente a los fármacos, un protocolo típico recomendado incluye el tratamiento con al menos un inhibidor de la proteasa más una combinación de dos análogos de nucleósidos (Tabla 26.3). Terapias con múltiples fármacos reducen la posibilidad de que aparezca un virus resistente ya que éste debería manifestar resistencia a tres compuestos diferentes de forma simultánea. Esta terapia combinada es seguida mediante RT-PCR para controlar la evolución de la carga vírica. Un protocolo efectivo es capaz de reducir la carga vírica a niveles no detectables (500 copias de HIV por mililitro de sangre) en varios días. La terapia es mantenida y controlada la carga vírica de forma indefinida. Si la carga vírica de nuevo alcanza límites detectables, el *cocktail* antirretrovítico es cambiado ya que un incremento en la carga vírica indica la emergencia de una población de virus resistente (Sección 24.10).

Además de la resistencia a los fármacos, algunos de estos compuestos son tóxicos para las células del hospedador. En muchos casos los análogos de nucleósidos no son bien tolerados por los pacientes, presumiblemente porque interfieren con las funciones celulares del hospedador, como es la división celular (Tabla 26.3) En general, los NNRTIs y los inhibidores de la proteasa son mejor tolerados ya que solo interfieren con las funciones del virus. Así pues, la resistencia a los fármacos y la toxicidad de los mismos son los mayores problemas en la terapia frente al HIV y nuevos agentes quimioterapeúticos y protocolos de administración están siendo constantemente desarrollados.

Inmunización frente al SIDA

La variabilidad genética del HIV nos hace estar lejos del desarrollo de una vacuna frente al SIDA. Una estrategia es construir anticuerpos frente a la proteína de la envuelta, gp120, y usarlos para bloquear la interacción CD4-gp120 (Figura 26.37) y por tanto bloquear la infección. No obstante esta aproximación no ha sido exitosa ya que el gen de gp120 muta muy frecuentemente dando lugar a variaciones antigénicas que no son reconocidas por los anticuerpos generados frente a otra distinta. El mejor resultado de las pruebas clínicas de inmunización se obtuvo con las *vacunas de subunidades* (Sección 31.6), donde genes de diferentes proteínas de la envuelta del HIV han sido introducidas en partículas de los virus vacinia o adenovirus, los cuales son inertes y se usan con vectores de expresión y vehículos para repartir los antígenos del HIV, diferentes vacunas de subunidades desarrollan una potente respuesta inmunitaria tanto humoral como celular frente al HIV. Los ensayos clínicos de la inmunización con subunidades están actualmente en desarrollo.

Otros potenciales candidatos a la inmunización incluyen *partículas intactas pero muertas del HIV*. El uso de estas vacunas inactivadas está restringido a individuos ya infectados ya que los protocolos de inactivación no matan el 100% de los virus; y no sería ética la exposición de individuos no afectados aunque el riesgo de infección sea muy limitado. Algunos laboratorios están explorando la posibilidad de producir *virus atenuados* para su uso como agentes inmunizantes. Esta estrategia se ve alentada por el hecho de que individuos infectados por el HIV-2, un virus relacionado que causa una muy ligera forma de SIDA con un periodo de incubación muy largo, previene la infección

Atención a ... Actividad sexual y SIDA

La promiscuidad sexual ha sido siempre asociada con las enfermedades de transmisión sexual, pero el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), discutido en este capítulo y a lo largo de este libro, centrando la atención en los peligros que entraña el tener múltiples parejas sexuales y en el riesgo asociado con ciertas prácticas sexuales. El SIDA causado por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), es solo un tipo de enfermedad transmitida por vía sexual. Otras enfermedades incluyen a la gonorrea, sífilis, herpes simple, uretritis no específica (causada por *Chlamydia*) vaginitis causadas por protozoos (*Tricomonas vaginalis*), vaginitis fúngicas (producida por *Candida albicans*), verrugas venéreas (causadas por el virus del papiloma humano). Algunas de estas enfermedades de transmisión sexual han sido asociadas con la sociedad humana por todos los historiadores. Sin embargo el SIDA es único. No existen fármacos o protocolos de inmunización para curar o prevenir el SIDA. Los fármacos usados en su tratamiento son caros y solo están disponibles en los países desarrollados, lo que implica que el 90% de los más de 30 millones de individuos infectados por el VIH no tienen acceso a la terapia. El SIDA actualmente mata más de 2 millones de personas cada año, y este número aumentará cuando las personas que hayan portado y extendido el virus durante más de 10 años desarrollen la enfermedad.

Debido a que el SIDA es relacionado con determinado tipo de prácticas sexuales, la prevención pasa por evitar ese tipo de conductas sexuales. Las autoridades sanitarias de los Estados Unidos han difundido un estudio que indica recomendaciones especiales para ser seguidas por los individuos para reducir las posibilidades de infección por HIV. Entre ellas están:

1. Evitar el contacto oral con el pene, la vagina o el recto.
2. Evitar cualquier actividad sexual que pueda causar cortes o desgarros en las paredes del recto, vagina o pene.
3. Evitar contactos sexuales con individuos que pertenezcan a grupos de alto riesgo. Esto incluye prostitutas (tanto hombres como mujeres), hombres homosexuales promiscuos, personas bisexuales, y personas adictas a drogas intravenosas.
4. Si una persona ha mantenido contactos sexuales con algún miembro de estos grupos debe determinar mediante una prueba de sangre si ha sido infectada por HIV. Si la prueba es positiva, es esencial que sus parejas sexuales se protejan de la infección mediante el uso de preservativos.

Es importante enfatizar que el SIDA no es una enfermedad exclusiva de los hombres homosexuales. En determinadas culturas el SIDA es igual de frecuente tanto en hombres como en mujeres. La enfermedad está ligada a la promiscuidad en las relaciones sexuales y otras actividades en que median intercambio de fluidos corporales, entre las que además de la homosexualidad masculina, se incluyen la prostitución femenina o el uso de drogas intravenosas.

¿Es entonces posible mantener relaciones sexuales sin riesgo de ser infectado de SIDA? Ciertas prácticas sexuales son mucho más seguras que otras. Prácticas seguras incluyen besos secos (con la boca cerrada), masturbación mutua (en ausencia de roturas o heridas en la piel) y relaciones sexuales empleando preservativos. Prácticas sexuales peligrosas incluyen: besos húmedos (con las bocas abiertas), masturbaciones en las que haya roturas de la piel, sexo oral (tanto masculino como femenino), relaciones sexuales sin protección (tanto vaginal como anal). Las autoridades sanitarias de los Estados Unidos han recomendado que si el estado de salud de la pareja es desconocido se debe usar un preservativo en todas las prácticas sexuales en las cuales haya intercambio de fluidos corporales.

La epidemia del SIDA ha centrado un renovado interés en el preservativo (ver foto). Los preservativos siempre juegan dos papeles en las relaciones sexuales: prevención frente a enfermedades y frente a un embarazo. Aunque el mejor medio de evitar el SIDA es evitar las prácticas de riesgo, si una relación sexual va a ser llevada a cabo con un individuo del que se desconoce su estado de infección, debe usarse un preservativo de látex. Las autoridades sanitarias de los Estados Unidos recomiendan encarecidamente el uso de preservativos en todas las relaciones sexuales extramaritales. En determinados países se están llevando a cabo campañas publicitarias para extender el uso de preservativos.

Los argumentos moralistas (monogamia, abstinencia, ausencia de actividad sexual fuera del matrimonio) no serán suficientes para controlar la epidemia del SIDA. Estudios epidemiológicos en todas las enfermedades sexuales previamente conocidas han demostrado que el miedo, por si solo no es suficiente para prevenir las actividades sexuales que conllevan peligro de contraer una enfermedad de transmisión sexual. El condicionamiento hacia el sexo de determinados individuos es tan fuerte que suprime cualquier miedo a la enfermedad, incluso en el caso de una enfermedad como el SIDA. Cada persona debe tomar la responsabilidad de autoprotegerse del esparcimiento de una enfermedad infecciosa tan extremadamente peligrosa como esta.

Para la última información en prevención del SIDA contactar con el CDC Red de prevención e información nacional en http://www.cdcnpin.org/. ■

TROJAN-EN
TROJAN-EN

John M. Martinko and Cheryl L. Broadie

con HIV-1, la cepa responsable del SIDA severo. No obstante hay riesgos potenciales muy serios. Por ejemplo, los virus integrados pueden producir cáncer, las mutaciones pueden reactivar la virulencia, etc.

En suma, existen alrededor de 20 diferentes protocolos de inmunización frente al SIDA en fase de ensayos clínicos, pero no se ha encontrado aún ninguno que sea efectivo. Además, la inmunización podría muy probablemente no ser útil en el tratamiento de los pacientes que ya han adquirido el virus ya que estos individuos carecen de las funciones inmunitarias y por ello no responderían a la vacuna. Así pues, a pesar de los considerables avances en el conocimiento molecular del HIV y en el conocimiento clínico del SIDA, la educación pública sobre el SIDA y el evitar los comportamientos de alto riesgo son todavía hoy las mejores herramientas para combatir el SIDA. (*Véase* el recuadro, «Actividad Sexual y SIDA», en este capítulo).

Detección de la infección por HIV

La exposición al HIV puede ser diagnosticada por medios inmunológicos. Tanto radioinmunoensayo (RAI) como los ensayos ELISA (*véase* Sección 24.11) han sido diseñados para analizar muestras de sangre y detectar la presencia de anticuerpos anti-HIV. Los ensayos del tipo ELISA han demostrado ser muy útiles para el análisis de muestras de sangre a gran escala, como es el caso del análisis de la sangre de donantes para la prevención de la transmisión del HIV por este medio. Las estadísticas muestran que alrededor del 0,25% (2 o 3 por cada mil) de todos los donantes de sangre en los Estados Unidos dan positivo en el ensayo de ELISA para HIV. Un resultado positivo en un ensayo de ELISA debe ser confirmado por un segundo método llamado *inmunotransferencia* (*Western Blotting*), una técnica que combina las técnicas de purificación de proteínas con las técnicas inmunológicas (*véase* Sección 24.12).

Otras pruebas rápidas están siendo desarrolladas y comercializadas para identificar la infección por HIV. Un test utiliza una sola gota de sangre del paciente y un único reactivo. El reactivo es un anticuerpo modificado bioquímicamente en el que un sitio de unión es dirigido frente a los glóbulos rojos de la sangre y el otro frente a un antígeno de superficie del virus, gp41. En una prueba positiva el anticuerpo bifuncional se une a ambos epitopos resultando en una aglutinación visible de los glóbulos rojos. (*véase* Sección 24.8). En otro test se usa la saliva como fuente de anticuerpos anti-HIV. La saliva se dispone en un recipiente que contiene antígenos del HIV inmovilizados. Se añade un segundo anticuerpo, reactivo frente al primer anticuerpo y conjugado a una enzima. Después se añade el sustrato de la enzima, y una reacción positiva es mostrada por la aparición de un producto coloreado de la reacción enzimática, al igual que ocurre en el ELISA (Sección 24.11). Los tests rápidos han sido diseñados para acelerar el proceso que pasa a pocos minutos en lugar de la horas o incluso días requeridos por el ELISA o la inmunotransferencia, también permiten una fácil interpretación y realización, fácil transporte, y almacenamiento. Sin embargo los tests rápidos no son tan sensibles ni fiables como las pruebas HIV-ELISA y HIV-inmunotransferencia. (*véanse* Secciones 24.11 y 24.12).

Todas las pruebas, no importa cuán exactas o sensibles, son capaces de detectar la infección en individuos que han sido recientemente contagiados y aún no han desarrollado anticuerpos frente al virus, lo cual puede tardar desde seis semanas a un año después de la infección. A pesar de este inconveniente, estos tests garantizan la seguridad de las donaciones de sangre y las estadísticas demuestran que el riesgo de contraer SIDA a través de una donación de sangre o de sus productos es actualmente muy reducida. La promiscuidad sexual y los grupos de adictos a drogas intravenosas son las principales vías actuales de transmisión de la infección (*véase* Figura 25.9).

✓ 26.14 Revisión de conceptos

El SIDA es una de las enfermedades infecciosas con mayor incidencia en la población humana. El HIV destruye el sistema inmunitario, y patógenos oportunistas, entonces, destruyen el hospedador. No existe aun vacuna efectiva contra el SIDA. Sin embargo, diferentes fármacos antivíricos están disponibles para retrasar el progreso de la enfermedad. Los métodos de prevención del SIDA y de su expansión pasan por evitar comportamientos tales como el uso de drogas intravenosas (compartir agujas), y practicas sexuales de riesgo.

✓ Recoja la definición de SIDA. ¿Qué aspectos diagnósticos son compartidos por todos los pacientes de SIDA?

✓ ¿Cuál es el actual tratamiento para la infección por HIV? ¿es efectivo? ¿Cuáles son los efectos secundarios?

Preguntas de repaso

1. ¿Por qué las bacterias Gram positivas producen enfermedades respiratorias más frecuentemente que las bacterias Gram negativas?
2. ¿Cuáles son los síntomas típicos de una infección respiratoria estreptocócica?¿Por qué deben tratarse rápidamente?
3. Describa los agentes causales y los síntomas de la difteria. ¿Cómo se puede prevenir?
4. Describa los agentes causales y los síntomas de la tos ferina. Describa los cambios en la tecnología de la vacuna que han tenido lugar para conseguir vacunas seguras.
5. Describa el proceso de infección de *Mycobacterium tuberculosis* ¿La infección siempre determina una tuberculosis activa?, ¿por qué o por qué no?
6. Describa los síntomas de la meningococemia y de la meningitis. ¿Cómo se tratan estas enfermedades?, ¿cuál es la prognosis para cada una de ellas?
7. Compare y contraste el sarampión, las paperas y la rubéola. Incluya en su discusión una descripción del

patógeno, los síntomas más importantes, y las consecuencias potenciales de estas infecciones. ¿Por qué es importante que las mujeres se vacunen de la rubéola antes de la pubertad?

8. ¿Por qué los resfriados y la gripe son enfermedades respiratorias tan frecuentes? Dé al menos dos razones de la alta incidencia de cada una de estas enfermedades.
9. Distinga entre estafilococos patógenos y aquellos que forman parte de la biota normal.
10. Describa las evidencias que unen a *Helicobacter pylori* con las úlceras gástricas. ¿Cómo se puede tratar a un enfermo con úlcera?
11. Describa los virus más importantes que producen hepatitis? ¿Cómo se relacionan entre ellos?
12. ¿Por qué la incidencia de la gonorrea aumentó dramáticamente a mediados de los años 60, mientras que la incidencia de la sífilis, en el mismo momento, descendía?
13. Describa los métodos empleados en el tratamiento de las enfermedades de transmisión sexual chlamydia, herpes y tricomoniasis. En cada caso, ¿es efectivo cómo cura el tratamiento?, ¿por qué o por qué no?
14. Describa cómo el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) elimina con gran eficiencia muchos de los aspectos, tanto de la inmunidad humoral como de la celular. ¿Hay alguna parte del sistema inmunitario que permanezca funcional en casos de SIDA?

Ejercicios prácticos

1. La mayoría de los estornudos generan aerosoles o gotas de mucus que contienen microorganismos. Las toses también generan una considerable cantidad de aerosoles así como esputo. ¿por qué las enfermedades transmitidas por los estornudos suelen ser enfermedades del tracto respiratorio superior?
2. Explique el origen de la fiebre reumática y la fuente de antígenos relacionados con esta enfermedad autoinmunitaria.
3. ¿Cuál es el reservorio de *Corynebacterium diphtheriae*? ¿Puede esta enfermedad erradicarse en humanos? ¿Cómo?
4. ¿Cómo puede controlarse una epidemia de tos ferina?¿cómo puede prevenirse? Dado que la incidencia de esta enfermedad está aumentado, aplique métodos de prevención a la actual epidemia (Figura 26.7). ¿Pueden ser métodos rentables?
5. ¿Por qué la tuberculosis a menudo desencadena una reducción permanente en la capacidad pulmonar, mientras que las otras enfermedades respiratorias esta reducción es momentánea?
6. Su compañero de laboratorio es diagnosticado de meningitis meningocócica, ¿qué debe hacer?
7. Sarampión, paperas, rubéola y varicela fueron consideradas enfermedades propias de la infancia. Sin embargo hoy son consideradas como infecciones muy serias. Explique este cambio de actitud en el contexto de la incidencia de las enfermedades, disponibilidad de vacunas y las consecuencias potenciales en la salud de cada una de las enfermedades.
8. Discuta sobre la biología molecular del cambio antigénico de los virus de la gripe y comente las consecuencias inmunológicas que tiene en el hospedador. ¿Por qué el cambio antigénico evita la producción de una única y universal vacuna para el control de la gripe? Seguidamente compare el cambio antigénico con la deriva antigénica. ¿Qué mecanismo es más importante para la evolución del virus de la gripe? ¿Cuál causa los mayores cambios antigénicos? ¿Cuál produce los mayores problemas para los productores de vacunas? ¿Por qué?
9. ¿Cómo puede eliminar los estafilococos resistentes a antibióticos de un hospital? Piense en términos de cambios físicos de las salas del hospital así como en cambios en el personal, control del personal, y requerimientos de protección en ropas, guantes, máscaras y demás.
10. Usando los postulados de Koch (Sección 1.5) como guía diseñe experimentos para probar que *Helicobacter pylori* causa las úlceras gástricas.
11. Organice los virus de la hepatitis de acuerdo a la severidad en la enfermedad que producen, tanto a largo como a corto plazo.
12. A pesar de la facilidad con la que la gonorrea y la sífilis pueden ser diagnosticadas y curadas, la incidencia se mantiene muy alta en un caso y muy baja en el otro. Explíquelo.
13. Como director de grupo de salud pública de su colegio mayor, ha sido encargado de educar a tus compañeros acerca de *Chlamydia*, herpes y tricomoniasis. Presente información de prevención, síntomas y tratamiento. ¿Pueden tus programas para cada infección ser coincidentes en algo? Para cada enfermedad discuta sobre aspectos sociales, legales, de salud pública que deban ser considerados en el caso de infección de los compañeros sexuales.
14. En términos de quimioterapia, ¿cómo se trata actualmente la infección por HIV? ¿Cómo se sigue el tratamiento? ¿Funciona el tratamiento?, ¿por qué o por qué no? Describa las diferentes posibilidades de vacunas frente al SIDA. ¿Cómo puede cada tipo inducir inmunidad frente al virus? ¿La inmunidad pasiva es de uso potencial en el tratamiento del SIDA? ¿Por qué o por que no? ¿Qué riesgos implica?

A lo largo de la historia, las enfermedades transmitidas por artrópodos, tales como la peste o la malaria, han causado la muerte a millones de personas y cambiado el curso de la historia del hombre y de la evolución. La enfermedad de Lyme, transmitida por artrópodos, causada por la picadura de la garrapata del género *Ixodes* (mostrado aquí) infectado con el patógeno de la enfermedad de Lyme, la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*, es una enfermedad infecciosa importante extendida en todo el mundo. Cualquier persona en América, Europa o Asia es susceptible de adquirir esta enfermedad de rápida emergencia si entra en contacto con garrapatas.

27

ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ANIMALES, POR ARTRÓPODOS Y POR MICROORGANISMOS DEL SUELO

I ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ANIMALES 906
27.1 La rabia 906
27.2 Síndrome pulmonar por hantavirus 908
II ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ARTRÓPODOS 909
27.3 Enfermedades producidas por *Rickettsia* 910
27.4 Enfermedad de Lyme 912
27.5 Malaria 915
27.6 La peste 918
III ENFERMEDADES TRANSMITIDAS A PARTIR DEL SUELO 921
27.7 Los hongos patógenos 921
27.8 Tétanos 923

Glosario

Anemia falciforme condición genética que confiere resistencia a la malaria pero que causa una reducción en la eficiencia de los glóbulos rojos para captar oxígeno

Ehrlichiosis de las enfermedades transmitidas por garrapatas, causadas por ricketsias del género *Ehrlichia*

Enfermedad de Lyme enfermedad emergente transmitida por las garrapatas y causada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*

Malaria enfermedad transmitida por insectos, caracterizada por episodios recurrentes de fiebre y anemia causada por el protozoo *Plasmodium spp.*, habitualmente transmitida a los mamíferos a través de la picadura del mosquito *Anopheles*

Micosis enfermedades causadas por hongos

Peste enfermedad epidémica transmitida por los roedores y causada por *Yersinia pestis*, y ocasionalmente transmitida a los hombres por la picadura de una pulga.

Rabia enfermedad neurológica generalmente mortal causada por el virus de la rabia, transmitida por la mordedura o la saliva de un carnívoro infectado.

Rickettsia parásito intracelular estricto que produce una importante variedad de enfermedades como el tifus, la fiebre de las montañas rocosas y ehrlichiosis.

Síndrome pulmonar por hantavirus (HPS) enfermedad vírica aguda, emergente, caracterizada por neumonía y transmitida por roedores.

Talasemia condición genética que confiere resistencia a la malaria pero causa una reducción en la eficiencia de los glóbulos rojos por la alteración de una enzima

Tétanos enfermedad que produce una rápida parálisis de los músculos, causado por una toxina producida por *Clostridium tetani*

Zoonosis enfermedad de los animales transmitida a los humanos

Las enfermedades transmitidas por insectos como la malaria o la peste han tenido una función muy importante en la historia de la humanidad. En la actualidad, las transmitidas por vectores como la enfermedad de Lyme y el síndrome pulmonar por hantavirus son importantes enfermedades infecciosas emergentes, incluso en países desarrollados. Las que presentaremos en este capítulo disponen de reservorios no humanos tales como los roedores. Estos animales pueden ser portadores de hantavirus o de la bacteria (espiroqueta) productora de la enfermedad de Lyme. Nuestra incapacidad para controlar las poblaciones de estos vectores y reservorios animales hace que el control de determinadas enfermedades sea casi imposible. Las enfermedades transmitidas a partir del suelo presentan mayores problemas aún, ya que los organismos del suelo no pueden ser ni erradicados ni controlados.

I ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ANIMALES

Aquí vamos a explicar algunos ejemplos de enfermedades transmitidas por animales. El hospedador natural para los patógenos transmitidos por animales es un vertebrado no humano. Las poblaciones de animales salvajes actúan como reservorio de estas enfermedades, haciendo la erradicación del patógeno improbable o imposible. Como veremos, cuando poblaciones de animales infectados entran en contacto con humanos, el resultado es la infección de estos últimos. Las enfermedades transmitidas por animales son generalmente extendidas a hospedadores humanos por contacto directo, aerosoles o mordedura. En el caso de enfermedades transmitidas por *vectores*, los patógenos son diseminados a hospedadores sin infectar a través de artrópodos que funcionan como vectores. De nuevo, los humanos son hospedadores accidentales en los ciclos de vida de los patógenos, aunque los humanos infectados sólo pueden actuar como reservorio, como en el caso de la malaria.

27.1 La rabia

Los animales contraen una serie de enfermedades infecciosas, algunas de las cuales pueden ser transmitidas a los humanos. Por fortuna, el uso de las prácticas de inmunización y el cuidado veterinario previene la mayoría de las enfermedades infecciosas en los animales domésticos y limita su contagio a los humanos. No obstante, la situación es diferente en lo concerniente a los animales salvajes. Los animales salvajes no pueden ser inmunizados rutinariamente y no reciben cuidados veterinarios. Así, las enfermedades animales transmitidas a los humanos (**zoonoses**) ocurren principalmente en poblaciones de animales salvajes, habitualmente siguiendo ciclos periódicos.

Biología y epidemiología

La rabia es una de las muchas enfermedades que ocurre primero en los animales y luego se extiende a los humanos bajo ciertas condiciones. El mayor reservorio de la rabia en Estados Unidos está en animales salvajes como mofetas, coyotes, zorros y murciélagos. No obstante, un pequeño pero significante número de casos se han dado en animales domésticos (Figura 27.1). La rabia es todavía una enfermedad importante en el hombre, en todo el mundo: aproximadamente 35 000 personas mueren anualmente de esta enfermedad, sobre todo en países en vías de desarrollo donde la rabia todavía es endémica en animales

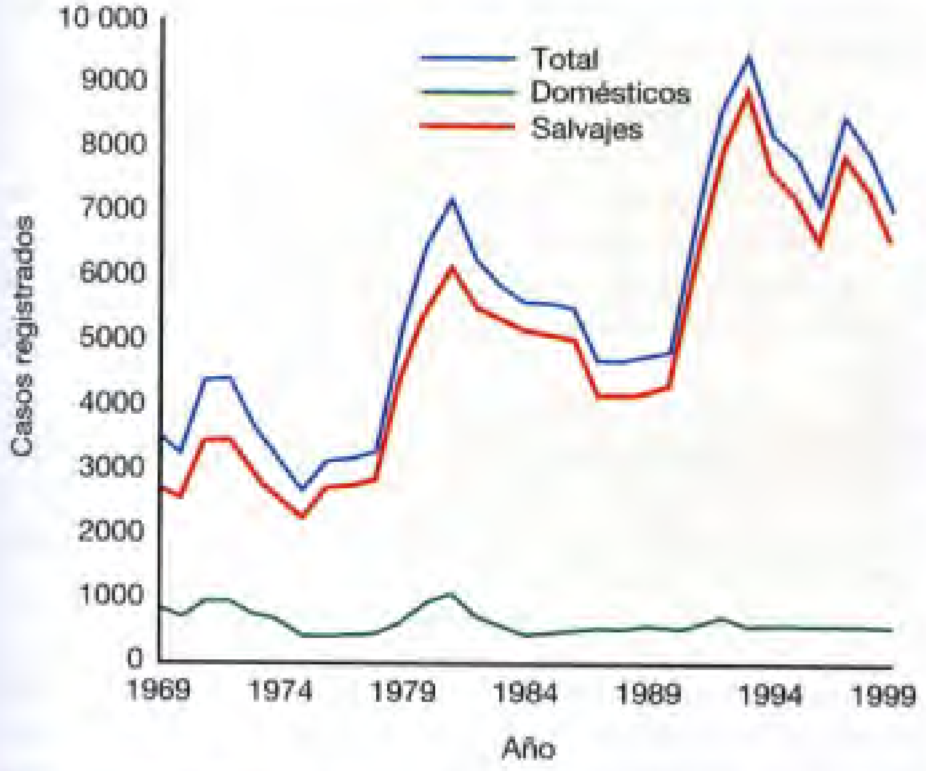


Figura 27.1 Casos de rabia en animales domésticos y salvajes en los Estados Unidos. Desde 1990 ha habido 25 casos de rabia en humanos, o 2.5 por año. La rabia es endémica en los animales salvajes de los Estados Unidos. El periódico aumento en casos registrados seguido de varios años de declive es el resultado de periódicas reemergencias de rabia en las poblaciones de animales salvajes, especialmente en mofetas en el noreste de Estados Unidos. Nótese que hay más de 500 casos de rabia en animales domésticos, presumiblemente adquiridos debido al contacto con animales salvajes. Los datos provienen de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, Atlanta, GA, EE.UU.

domésticos como perros, y alrededor de un millón de personas de todo el mundo recibe tratamiento frente a la rabia debido a mordeduras de animales. La rabia es causada por un miembro de la familia *Rhabdoviridae*, género *Lysavirus* (un virus RNA de cadena sencilla con polaridad negativa) (*véase* Sección 16.8) que infecta el sistema nervioso central de la mayoría de animales de sangre caliente, causando invariablemente la muerte si no es tratado. El virus presente en la saliva de los animales rabiosos entra en el cuerpo a través de la herida de una mordedura. El virus de la rabia se multiplica en el sitio de entrada y después viaja hasta el sistema nervioso central. El tiempo de incubación para que se manifiesten los síntomas es muy variable, dependiendo del tamaño, de la localización, de la profundidad de la herida y del número de partículas víricas transmitidas en la mordedura. En perros, el periodo de incubación es de 10 a 14 días. En humanos, pueden pasar más de nueve meses antes de que aparezcan los síntomas de la rabia.

Patogénesis

El virus prolifera en el cerebro (especialmente en el tálamo y en el hipotálamo), produciendo fiebre, excitación, dilatación de las pupilas, salivación excesiva y ansiedad. El miedo a beber (hidrofobia) da lugar a espasmos incontrolables de los músculos de la garganta; la muerte, eventualmente aparece como consecuencia de la parálisis respiratoria. En humanos la rabia *no tratada* que progresa hasta la fase sintomática es casi siempre mortal.

Tratamiento, diagnóstico y prevención

Debido a la naturaleza mortal de la rabia, cualquier contacto con animales infectados debe ser tratado con seriedad. Un animal salvaje sospechoso de tener rabia debe ser capturado, sacrificado e inmediatamente analizado para determinar si está infectado. Si se trata de un animal doméstico como un perro, gato o hurón, especialmente si la mordedura no ha sido provocada, se mantiene el animal durante diez días en observación para ver si desarrolla los síntomas de la rabia. Si el animal es salvaje y muestra los síntomas de la rabia, o no puede hacerse la determinación después de diez días, el paciente debe ser inmunizado pasivamente con inmunoglobulinas frente a la rabia (anticuerpos purificados frente al virus de la rabia obtenidos de un individuo hiperinmune) (*véase* Sección 22.11), inyectado intramuscularmente y en el sitio de la mordedura. El paciente debe ser también inmunizado con una preparación inactivada del virus de la rabia. Un resumen de las directrices para tratar posibles exposiciones humanas a la rabia se muestra en la Tabla 27.1. Debido a la lenta progresión de la rabia en humanos, esta terapia combinada es efectiva en

TABLA 27.1 Directrices para tratar una posible exposición humana al virus de la rabia

Mordedura no provocada por un animal doméstico

Animal sospechoso de rabia	*Animal no sospechoso de rabia*
1. Sacrificar el animal y comprobar si tiene rabia.	1. Mantener el animal durante diez días, si no hay síntomas de rabia, no tratar al humano.
2. Comenzar el tratamiento inmediatamente[a].	2. Si aparecen síntomas tratar al humano inmediatamente[a].

Mordedura por un carnívoro salvaje (mofeta, murcielago, zorro o coyote)

Animal rabioso

1. Sacrificar el animal y comprobar si tiene rabia.
2. Comenzar el tratamiento inmediatamente[a].

Mordedura por un roedor salvaje, ardilla, conejo o ganado

Consultar a los responsables de la salud local o regional acerca de posibles casos de rabia transmitidos por estos animales (raramente transmiten la rabia). Si no ha habido casos registrados, no hay de qué preocuparse.

[a] Todas las mordeduras deben ser profundamente lavadas con agua y jabón. El tratamiento es generalmente una combinación de inmunoglobulinas frente a la rabia y la vacuna antirrábica obtenida por cultivo del virus en líneas celulares diploides humanas (cinco inyecciones intramusculares).

casi el 100% de los casos, deteniendo la aparición de la enfermedad. La rabia es diagnosticada en el laboratorio mediante el análisis de muestras de los tejidos. Tests con anticuerpos fluorescentes (*véase* Sección 24.10) que reconocen el tejido del cerebro o la cornea infectado por la rabia se usan para confirmar el diagnóstico, tanto en un posible animal rabioso como en una observación postmortem en el caso de humanos. Además, aparecen cuerpos de inclusión de los virus característicos en los citoplasmas de las células nerviosas, llamados *cuerpos Negri*, también obtenidos a partir de una biopsia o en muestras *postmortem*.

La rabia puede prevenirse mediante una apropiada práctica de inmunización. Diversas vacunas a base de virus inactivados son empleadas en Estados Unidos tanto para humanos como para animales domésticos, y una importante variedad de vacunas con virus inactivados o atenuados se emplean en todo el mundo. Como comentamos anteriormente, la mayoría de los casos de rabia en humanos puede prevenirse mediante la pronta inmunización: debido al largo periodo de incubación, la inmunización pasiva y activa de individuos potencialmente expuestos es suficiente para prevenir la infección. No obstante, la inmunización profiláctica no es generalmente recomendada en los humanos, excepto en individuos de alto riesgo como veterinarios o personal de control de animales.

La estrategia de prevención de la rabia aquí descrita ha sido extremadamente efectiva y poco más de tres casos de rabia humana por año han sido registrados en Estados Unidos, casi siempre como resultado de la mordedura de una animal salvaje. Los animales domésticos son otra cuestión, ya que frecuentemente están expuestos al contacto con animales salvajes, y todos los perros y gatos deben ser vacunados a los tres meses de edad y después con dosis de recuerdo cada año o cada tres años. Otros animales domésticos como los grandes animales de granjas son a menudo también inmunizados frente a la rabia. No obstante, la clave en la lucha contra la rabia, al menos en Estados Unidos, reside en el control de la enfermedad en el gran reservorio que el virus tiene en los animales salvajes (Figura 27.1). Si todos o la mayoría de los potenciales reservorios de la enfermedad fueran inmunes, la enfermedad podría ser detenida e incluso erradicada. Actualmente, las vacunas de subunidades en las que genes que producen proteínas de la cubierta del virus son expresados en el virus vaccinia (virus de la viruela) están disponibles (*véase* Sección 31.6). Debido a que para que sea efectivo han de ser administradas oralmente, las vacunas de subunidades deben ser incluidas en «trampas alimenticias» (carne inoculada con la vacuna) y usadas para inmunizar a animales susceptibles, y así reducir la incidencia y el esparcimiento de la enfermedad. Estas vacunas son una buena herramienta para controlar el reservorio animal de la enfermedad y pueden determinar la erradicación de la misma.

✓ 27.1 Revisión de conceptos

La rabia infecta inicialmente a animales salvajes en Estados Unidos, pero puede transmitirse a los animales domésticos o a los humanos. La vacunación de perros y gatos es crucial para el control de la rabia. En los países en vías de desarrollo, la rabia es endémica en animales domésticos y todavía es una enfermedad humana importante.

- ✓ ¿Por qué la vacuna de la rabia no se administra a los humanos de forma rutinaria en Estados Unidos?
- ✓ ¿Cuál es el protocolo para el tratamiento de un paciente mordido por un animal que no ha sido atrapado?
- ✓ ¿Qué ventajas presenta la vacuna oral sobre la parenteral en el control de los animales salvajes?

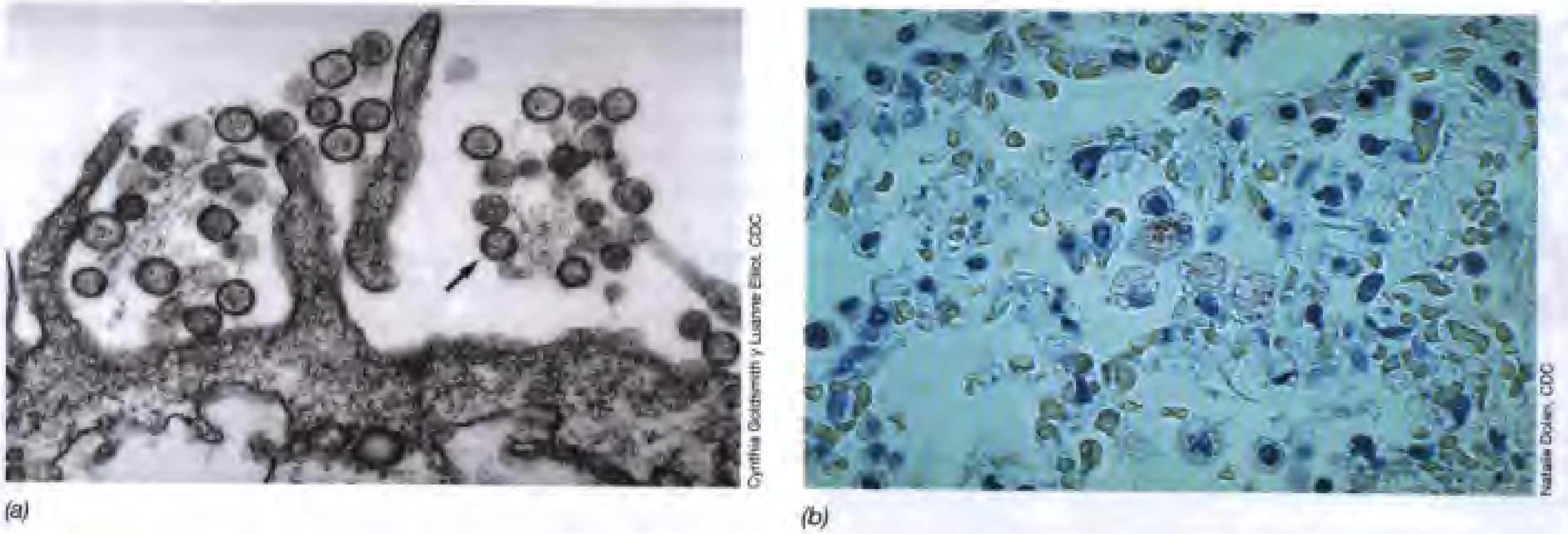
27.2 Síndrome pulmonar por hantavirus

En 1993 un cepa de hantavirus apareció en Estados Unidos como la causa de una agudo síndrome respiratorio hoy conocido como **síndrome pulmonar por hantavirus (HPS)**. El brote de hantavirus se produjo en «Four Corners», región de Estados Unidos (Arizona, Colorado, Nuevo México y UTA) y fue transmitido por una población de roedores (*Peromyscus maniculatis*) de esa área. El brote causó 32 muertes de 53 adultos infectados, infravalorándose el potencial peligro de brotes debido a las en enfermedades que son directamente transmitidas por una gran variedad de otros animales, muchas veces sobre nuevas o inusuales circunstancias. Los hantavirus están relacionados con otros muchos virus que producen fiebres hemorrágicas tales como el virus de la fiebre de Lassa o el virus Ébola (*véase* Sección 25.10), todos ellos ocasionalmente transmitidos a los humanos desde los reservorios animales.

Biología y epidemiología

El género *Hantavirus* es miembro de la familia *Bunyaviridae*, una familia de virus de RNA de cadena sencilla (monocatenario) con polaridad negativa y envoltura (*véase* Sección 9.11) (Figura 27.2). La familia *Bunyaviridae* incluye virus que producen el *síndrome pulmonar por hantavirus (HPS)* y la *fiebre hemorrágica con síndrome renal (HFRS)*. Los virus fueron primero detectados en roedores, incluyendo ratones, ratas de diferentes especies, conejos de Noruega y campañoles, y ocasionalmente en otros animales. Las cepas de HFRS también encontradas en roedores son más comunes en el hemisferio oriental y han sido relacionadas con un importante número de brotes de HFRS en los últimos años. Más de 200 000 casos por año han sido reconocidos principalmente en China, Corea y Rusia. La cepa HSP tiene mayor incidencia en el hemisferio oeste y la continuada investigación de la ecología de estos virus es probable que desvele nuevas cepas patógenas de éstos.

Los hantavirus se transmiten más frecuentemente por la inhalación de excrementos de roedores contaminados con el virus. Los humanos parecen ser un hospedador accidental y sólo son infectados cuando están en contacto con roedores y sus heces. Por ejemplo, todos los individuos que adquirieron HPS en el brote de Four Corners habían estado expuestos a ratones o a sus desechos como resultado del cálido invierno de 1993 y un inusual aumento del número de roedores (*véase* Sección 25.10). La vía de transmisión a través de aerosoles es más frecuente cuantos más aerosoles se han generado, debido al polvo producido a partir de la orina o las heces desecadas de los ratones. Hay casos muy



Cynthia Goldsmith y Luanne Elliot, CDC

Natalie Dolan, CDC

Figura 27.2 Hantavirus. (a) Fotografía electrónica del hantavirus Sin Nombre. La flecha indica uno de los virus. El virus mide aproximadamente 0,1 micras de diámetro. (b) Tinción inmunológica de los antígenos del hantavirus Andes en macrófagos alveolares. Cada gránulo azul oscuro indica la infección de un macrófago (aproximadamente de 15μm de diámetro). Los hantavirus pertenecen a la familia Bunyaviridae y, como muchos virus filogenéticamente similares (por ejemplo el virus del Valle del Rift o el virus Ébola) producen fiebres hemorrágicas con una tasa de mortalidad muy alta en humanos.

raros de transmisión persona a persona, al igual que lo es la infección por la mordedura de un roedor.

Patología, diagnóstico, tratamiento y prevención

El síndrome pulmonar por hantavirus se caracteriza por fiebre repentina, mialgia, trombocitopenia (reducción del número de plaquetas en sangre), leucocitosis (incremento en el número de linfocitos circulantes) y pérdida de fluido por los capilares pulmonares. La muerte ocurre en cuestión de algunos días en el 50% de los casos, usualmente debido a un shock unido a complicaciones cardiacas determinadas por el edema pulmonar (la liberación de líquido en los pulmones que causa asfixia). Estos síntomas son los típicos del virus Sin Nombre que provocó el brote en Four Corners, sin embargo gran variedad de otros síntomas puede aparecer dependiendo de la cepa del virus que cause la enfermedad. Por ejemplo, la cepa Bayou, común en los roedores del sureste de Estados Unidos también causa fallos renales.

Si los hantavirus aislados de infecciones pueden ser cultivados en cultivos de tejidos (*véase* Sección 9.11), la cepa puede ser identificada por técnicas serológicas como los ensayos de reducción y neutralización en placa. Frecuentemente se realiza ELISA en pacientes, para determinar la presencia de anticuerpos, lo que indica la exposición y el desarrollo de una respuesta inmunitaria (*véase* Sección 24.11), o la presencia del genoma vírico, que indica infección y es detectado mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando sangre o muestras de tejido del paciente (*véase* Sección 24.1).

No existe tratamiento específico frente al virus ni vacuna para ninguno de los hantavirus. La enfermedad puede ser prevenida evitando el contacto con los roedores y con su hábitat, ya que el principal modo de transmisión es a través de los excrementos de los roedores. La reducción de la exposición implica la destrucción del hábitat de los roedores, y la restricción de sus fuentes de alimento (por ejemplo, almacenando la comida en contenedores cerrados) y programas agresivos de exterminación de roedores. La prognosis a largo plazo para la erradicación de la enfermedad es muy pobre debido al considerable porcentaje de la población de roedores de una determinada área que se encuentra infectado por una cepa local de hantavirus. Por ejemplo, pruebas serológicas retrospectivas de los **DEER MICE** en la zona de Four Corners en 1993 indicaron que el 30% de la población local de ratón era portadora del hantavirus Sin Nombre.

✓ 27.2 Revisión de conceptos

Los hantavirus aparecen en todo el mundo en las poblaciones de roedores, produciendo enfermedades serias por el síndrome pulmonar de los hantavirus (HPS) que accidentalmente puede llegar a los humanos. En Estados Unidos, las infecciones por hantavirus no fueron registradas hasta 1993.

- ✓ ¿Por qué no se reconoció en Estados Unidos hasta 1993 que los hantavirus eran un importante problema de salud pública?
- ✓ Describa la transmisión de los hantavirus a los humanos. ¿Cuáles son las medidas efectivas para prevenir la infección por hantavirus?

II ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ARTRÓPODOS

Los patógenos pueden ser transmitidos a los hospedadores por la picadura de un artrópodo infectado que funciona a modo de vector de infección. En muchos casos, como en el de las enfermedades producidas por *Rickettsia*, los humanos son hospedadores accidentales del patógeno. No obstante, los humanos infectados pueden jugar un papel crítico en el ciclo de vida del patógeno, como en el caso de la malaria.

27.3 Enfermedades producidas por *Rickettsia*

Las *Rickettsia* son bacterias pequeñas estrictamente intracelulares en vertebrados, habitualmente mamíferos y que están asociadas en algún punto de su ciclo vital con artrópodos chupadores de sangre como pulgas, piojos o garrapatas. Ya comentamos la biología de las *Rickettsia* en la Sección 12.13. Las *Rickettsia* producen una variedad de enfermedades en humanos y animales, las más importantes de las cuales son la fiebre tifoidea, la fiebre de las Montañas Rocosas y la ehrlichosis. Las *Rickettsia* toman su nombre de Howard Ricketts, científico de la Universidad de Chicago que fue el primero en demostrar su existencia y que murió como consecuencia de la infección con la ricketsia que produce el tifus, *Rickettsia prowazekii*. No se ha conseguido cultivar las *Rickettsia* en medios artificiales pero sí en animales de laboratorio, piojos, en cultivo de células de mamíferos y en el saco de embriones de garrapatas. En animales, el crecimiento tiene lugar primeramente en células fagocíticas (*véase* Sección 22.2). Aunque las *Rickettsia* no se han cultivado en cultivo axénico en el laboratorio, el genoma de *Rickettsia prowazekii* de 1.1 Mb ha sido secuenciado (*véase* Sección 15.3). Basandonos en la homología con otras secuencias genómicas, estos parásitos intracelulares están muy relacionados con las mitocondrias humanas. Como en las mitocondrias, el genoma de ricketsia se ha reducido en tamaño hasta contener un conjunto de genes necesarios y suficientes para su dependencia intracelular. Las ricketsias carecen de muchos de los genes necesarios para un metabolismo energético independiente o para la biosíntesis de estructuras. El genoma de ricketsia contiene un grupo de genes, muy relacionados con el operón *virB* del patógeno de plantas *Agrobacterium tumefaciens* (*véase* Sección 19.21). Este operón codifica componentes de los determinantes de virulencia implicados en la transferencia de DNA y sistemas de exportación de proteínas. Así pues, la secuencia del genoma muestra la dependencia intracelular y la virulencia de estos patógenos.

Las *Rickettsia* se dividen en tres grupos, según las enfermedades que producen. Los grupos son: (1) el *grupo del tifus*, por *Rickettsia prowazekii*; (2) el grupo de *la fiebre manchada*, por *Rickettsia rickettsii*; y (3) el *grupo de la ehrlichiosis*, por *Ehrlichia chaffeensis*. Aquí examinaremos un ejemplo de un patógeno de cada grupo.

El grupo del tifus: *Rickettsia prowazekii*

El tifus es causado por *Rickettsia prowazekii*. La epidemia del tifus se transmite entre los humanos por los piojos del cuerpo o de la cabeza. El reservorio animal del tifus son los humanos y puede ser una enfermedad muy seria. Durante la primera guerra mundial una epidemia de tifus se extendió por todo el este de Europa y causó al menos tres millones de muertes. El tifus ha sido un problema entre las tropas militares durante los tiempos de guerra. Debido a la insalubridad y lo apurado de las condiciones características de las operaciones de infantería en tiempo de guerra, los piojos se extienden fácilmente entre los soldados, y el tifus alcanza proporciones epidémicas. Hasta la segunda guerra mundial el tifus causó más muertes en militares que el combate.

Las células de *R. prowazekii* se introducen a través de la piel cuando el pinchazo producido por la picadura de un piojo se contamina con la heces del mismo, la mayor fuente de las células de *Rickettsia*. Durante un periodo de incubación de 1 a 3 semanas, el organismo se multiplica en el interior de las células que recubren los vasos sanguíneos pequeños. Los síntomas del tifus (fiebre, dolor de cabeza y debilidad general) entonces comienzan a aparecer. Entre cinco y nueve días después, una erupción característica se observa en las axilas y se distribuye por todo el cuerpo *excepto* cara, palmas de las manos y plantas de los pies. Las complicaciones de las infecciones no tratadas de tifus provocan daño en sistema nervioso central, pulmones, riñones y corazón. El tifus epidémico tiene una mortalidad del 6 al 30%. La tetraciclina y el cloranfenicol son los más utilizados para controlar a *R. prowazekii*.

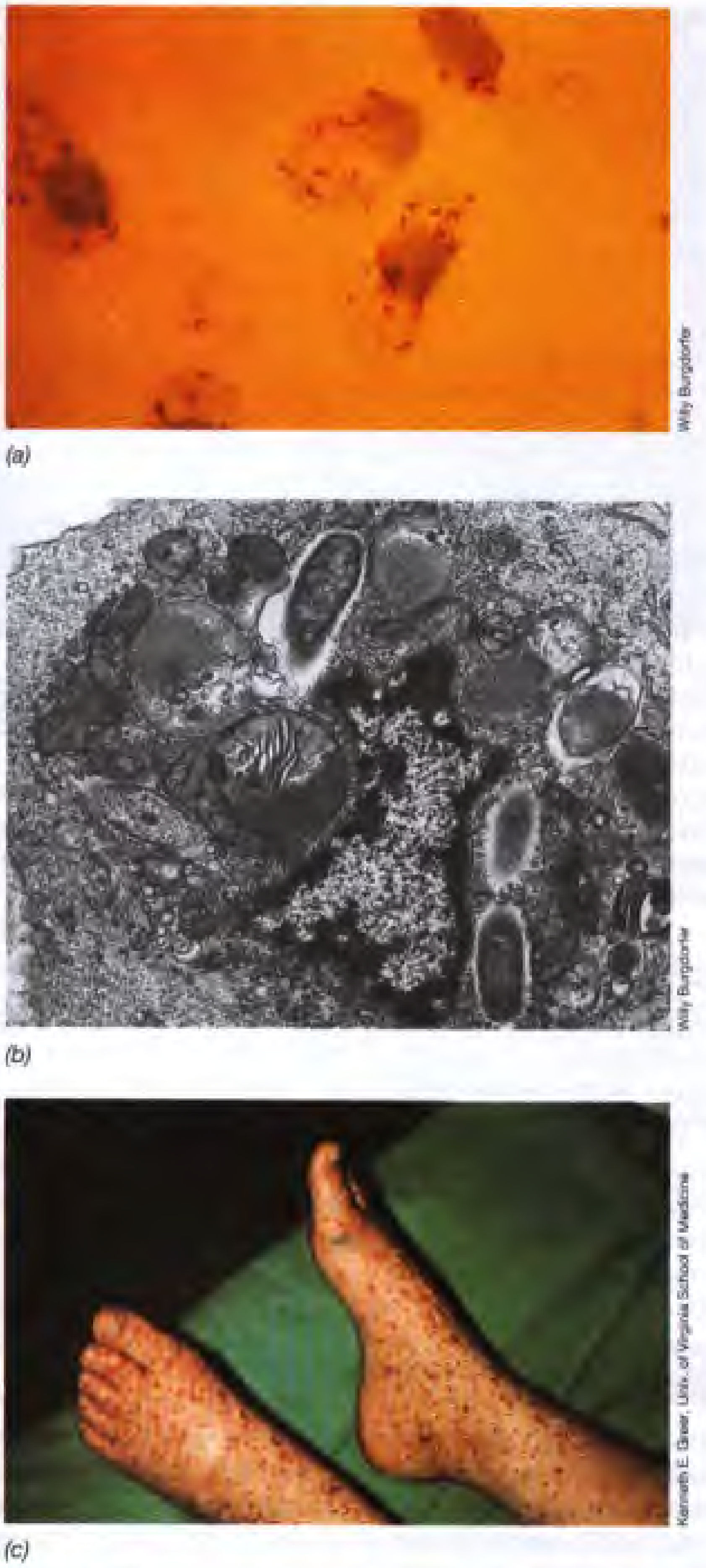
Rickettsia typhi, el organismo que causa el tifus murino, es otro patógeno importante de este grupo.

El grupo de la fiebre manchada: *Rickettsia rickettsii*

La fiebre de las Montañas Rocosas fue reconocida por primera vez en el oeste de Estados Unidos alrededor de 1900, pero hoy tiene mayor incidencia en el sureste. La fiebre de las Montañas Rocosas es causada por *Rickettsia rickettsii* y se transmite a los humanos por diferentes especies de garrapatas, las más comunes son las del perro y la de la madera (Figura 27.3). Los humanos adquieren el patógeno desde las heces de las garrapatas, que son inyectados en el cuerpo durante la picadura, o a través del acto de rascarse, lo que produce laceraciones por donde entra el patógeno. Las células de *R. rickettsii*, a diferencia de otras ricketsias, crecen tanto en el núcleo de la célula hospedadora como en el citoplasma (Figura 27.3*a* y 27.3*b*). Después de un periodo de incubación de 3 a 12 días, aparecen súbitamente los síntomas, como fiebre y un fuerte dolor de cabeza. Tras 3 o 5 días aparece una erupción en todo el cuerpo (Figura 27.3*c*). Problemas gastrointestinales como diarrea y vómitos también son muy comunes, y los síntomas pueden durar hasta dos semanas si la enfermedad no es adecuadamente tratada. La tetraciclina o el cloranfenicol generalmente producen una rápida recuperación de la enfermedad si se administra al inicio de la misma.

El grupo de la ehrlichiosis: *Ehrlichia*

El género *Ehrlichia* (*véase* Sección 12.13) es responsable de dos enfermedades emergentes transmitidas por garrapatas en Estados Unidos, **ehrlichiosis monocítica humana (HME)** y **ehrlichiosis granulocítica humana (HGE)**. Las ricketsias que producen estas enfermedades son *Ehrlichia chaffeensis* y un organismo similar o idéntico a *Ehrlichia equi*, respectivamente. La aparición de estas dos enfermedades clínicamente indistinguibles se caracteriza por síntomas como los de un catarro que incluye fiebre, dolor de cabeza, malestar, y frecuentemente leucopenia (número de leucocitos redu-

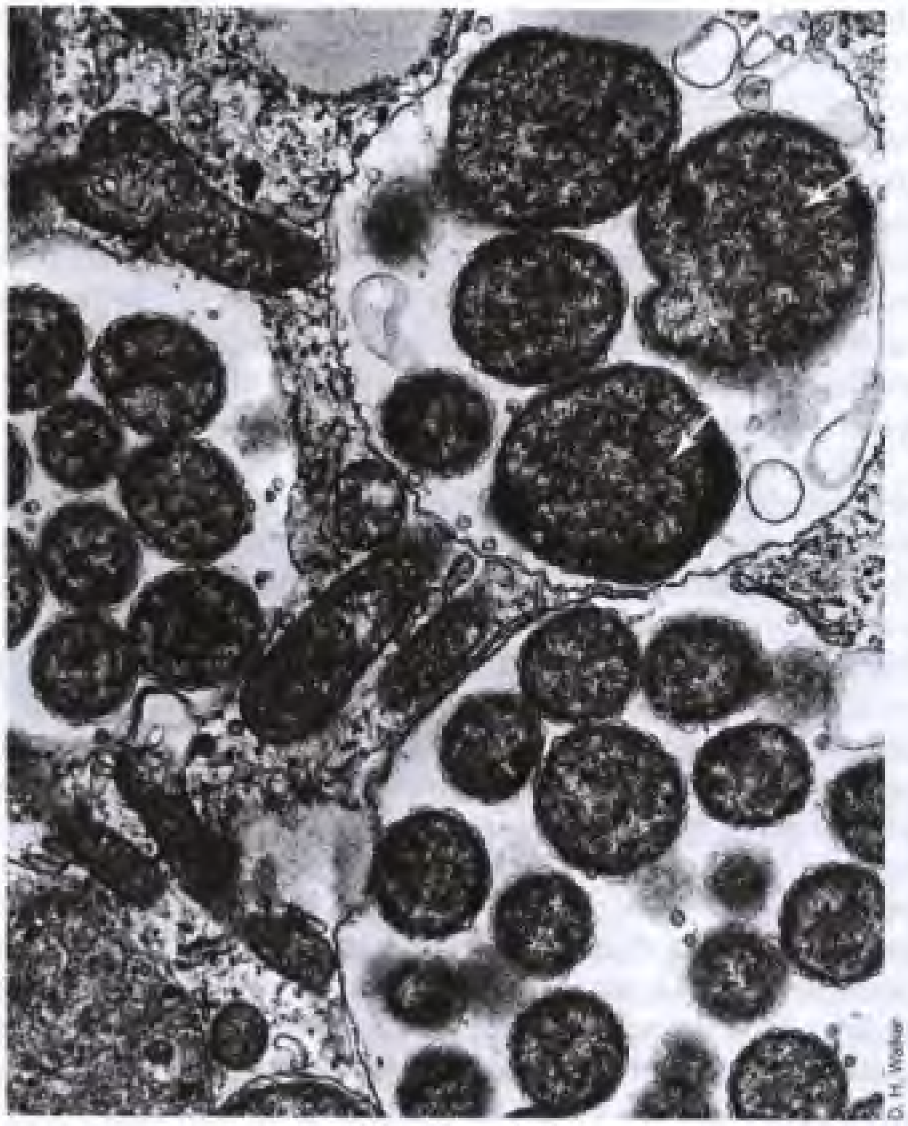


Willy Burgdorfer

Willy Burgdorfer

Kenneth E. Greer, Univ. of Virginia School of Medicine

Figura 27.3 *Rickettsia rickettsii*, en agente causante de la fiebre de las Montañas Rocosas. (a) Células de *Rickettsia rickettsii* creciendo en el citoplasma y núcleo de hemocitos de garrapata. (b) Células de *R. rickettsii* en un hemocito granular de una garrapata de la madera infectada, *Dermacentor andersoni*. Fotografía electrónica de transmisión. (c) Erupción de la enfermedad en los pies.



D. H. Walker

Figura 27.4 *Ehrlichia chaffeensis*, el agente causante de la ehrlichiosis monocítica humana (HME). La micrografía electrónica muestra inclusiones en un monocito humano que contiene grandes cantidades de *E. chaffeensis*. Las flechas indican dos de las muchas bacterias de cada inclusión. *E. chaffeensis* varía entre 300 y 900 nm de diámetro.

cido) y/o trombocitopenia. Hallazgos en el laboratorio frecuentemente documentan cambios en la función hepática caracterizados por el aumento de una enzima hepática, la transaminasa. Además, los linfocitos de la sangre periférica muestran evidentes inclusiones de células de *Ehrlichia* (Figura 27.4). Los síntomas, excepto las inclusiones, son similares a los de otras rickettiosis, aunque el género *Ehrlichia* es antigénicamente distinto de los miembros de los otros grupos de ricketsias. Las gravedad de las infecciones va desde subclínicas hasta mortales. Complicaciones a largo plazo en casos progresivos y no tratados pueden incluir insuficiencias renales y respiratorias, y serias afectaciones neuronales. El diagnóstico se basa en un ensayo de fluorescencia indirecta con anticuerpos (IFA) de suero del paciente (*véase* Sección 24.10) y también en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de sangre completa o de suero del paciente para detectar la presencia de DNA de *Ehrlichia* (*véase* Sección 24.13).

La infección se transmite por las picaduras de garrapatas infectadas; los reservorios en mamíferos incluyen ciervos y posiblemente roedores, además de los hospedadores humanos. Análisis serológicos retrospectivos, en áreas con relativa alta incidencia de enfermedad transmitida por las garrapatas, indican que el HGE puede tener una incidencia mayor que la fiebre de las Montañas Rocosas. La mayoría de las infecciones no son apropiadamente identificadas debido a lo variable de la naturaleza de los síntomas. Sin embargo, desde 1985 más de 800 casos han sido verificados en Estado Unidos por los Centros de Control de Enfermedades. Desde 1998, la ehrlichiosis ha sido una enfermedad reconocida nacionalmente (*véase* Sección 25.8) y en 1999, el primer año de recuento, fueron diagnosticados más de 300 casos, con HME concentrado en el noreste y en los estados de la zona atlántica central; y en el HGE centrado en los estados de la zona atlántica sur y Arkansas. Estos patrones sugieren que la ehrliasis será más registrada de acuerdo los médicos estén más familiarizados con ella. El número de casos está incrementándose y representan, como la enfermedad de Lyme (*véase* Sección 27.4), una enfermedad emergente transmitida por garrapatas.

Como otras infecciones transmitidas por garrapatas, las actividades en el campo en zonas donde hay garrapatas infectadas es el mayor factor predisponente a la adquisición de la enfermedad: jugadores de golf y excursionistas están particularmente expuestos. La prevención individual implica reducir la exposición a las garrapatas y a su picadura evitando su hábitat, vistiendo ropas apropiadas para evitar las picaduras y mediante la aplicación de repelentes de insectos. En cuanto a la protección de la comunidad, las poblaciones de garrapatas pueden ser reducidas mediante la aplicación extensiva de acaricidas (productos químicos específicamente tóxicos para las garrapatas y artrópodos relacionados) y la eliminación del hábitat de las garrapatas, como son la hojarasca y los arbustos. La doxiciclina, un derivado de la tetracilina semisintética, es el antibiótico adecuado para los tratamientos de ehrlichiosis.

Otras enfermedades producidas por ricketsias

La *fiebre Q* es una infección similar a una neumonía causada por un parásito intracelular estricto, *Coxiella burnetii*, relacionado con las ricketsias (*véase* Sección 12.13). Aunque no se transmite a los humanos directamente por la picadura de un insecto, el agente etiológico de la fiebre Q es transmitido a los animales por la picadura de insectos, y varios artrópodos sirven como reservorio de la misma. Los animales domésticos generalmente tienen infecciones inaparentes, pero pueden tener grandes cantidades de células de *C. burnetii* en su orina, heces, leche y otros fluidos corporales. El contacto con estos animales o sus productos es una fuente de infección para los humanos. El resultado es una enfermedad similar a la gripe que puede progresar produciendo una prolongada fiebre, dolor de cabeza, escalofríos, dolor en el pecho, neumonía y endocarditis. La confirmación de la infección con *C. burnetii* puede realizarse por una variedad de pruebas inmunológicas diseñadas para medir los anticuerpos del hospedador frente al patógeno. Una prueba con anticuerpos fluorescentes (IFA) es la prueba serológica de elección (*véase* Sección 24.10). Las infecciones por *C. burnetii* responden a la tetraciclina y la terapia se debe empezar rápidamente en cualquier caso sospechoso de fiebre Q para prevenir el daño cardiaco. Por último, la fiebre Q es una de las enfermedades infecciosas que se han estudiado como posible agente para armas biológicas (*véase* Sección 25.11)

El tifus de los matorrales (o de las malezas), o *enfermedad tsutsugamushi*, está restringido a Asia, India y Australia, y es causado por *Orientia tsutsugamushi*. Aunque la enfermedad es similar al tifus, es transmitida por *ácaros* a su hospedadores normales, los roedores.

Diagnóstico y control de las enfermedades causadas por *Rickettsia*

En el pasado, las infecciones por ricketsias eran muy difíciles de diagnosticar ya que la erupción característica de muchas de estas enfermedades puede ser confundida con el sarampión, la escarlatina o reacciones adversas a medicamentos. Las confirmaciones clínicas de las enfermedades causadas por ricketsias has sido muy favorecidas por la introducción de reactivos inmunológicos específicos. Entre ellos están incluidos las pruebas basadas en anticuerpos que detectan antígenos de superficie del patógeno por inmunofluorescencia, ensayos de aglutinación de bolas de látex y análisis de ELISA (*véanse* Secciones 24.8, 24.10 y 24.11) y ensayos de PCR (*véase* Sección 24.13). El control de la mayoría de las enfermedades causadas por las ricketsias requiere el control de los vectores de transmisión: piojos, pulgas y garrapatas. Para personas que atraviesen zonas arbóreas, se recomienda el uso de repelentes de insectos, ya que previene normalmente de las picaduras. Las garrapatas firmemente unidas al hospedador deben ser retiradas con pinzas y con cuidado de no dejar partes del parásito (como la cabeza) dentro del hospedador. Un solvente como el etanol, aplicado con un algodón, facilita la eliminación del parásito. Aunque se dispone de una vacuna para la prevención del tifus, la escasez de casos registrados no recomienda la administración general. Actualmente no hay vacunas disponibles para la prevención de la fiebre de las Montañas Rocosas o la ehrlichiosis.

✓ 27.3 Revisión de conceptos

Las ricketsias son patógenos intracelulares estrictos transmitidos por artrópodos. La mayoría de estas infecciones están controladas por la terapia antibiótica, pero el diagnóstico y el reconocimiento temprano de estas enfermedades es aún difícil.

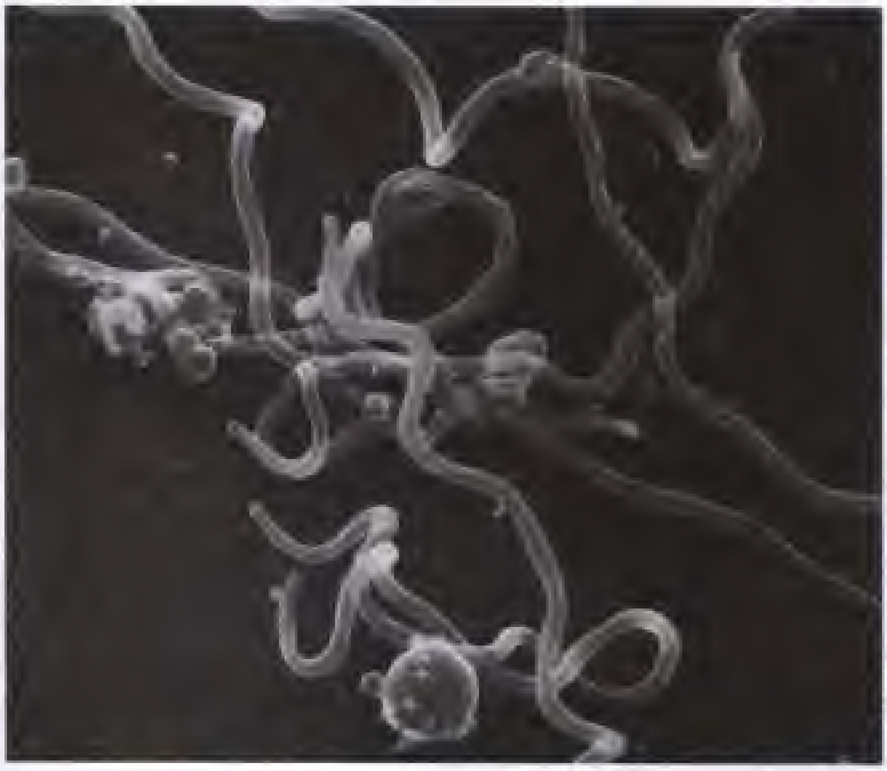
- ✓ ¿Cuáles son los artrópodos vectores para el tifus, la fiebre de las Montañas Rocosas y la ehrlichiosis?
- ✓ ¿Cuáles son los mamíferos hospedadores para las anteriores enfermedades?

27.4 Enfermedad de Lyme

La enfermedad de Lyme es una enfermedad emergente transmitida por garrapatas, que afecta al hombre y otros animales. La enfermedad de Lyme debe su nombre a Old Lyme, en Conneticut, donde se recogieron los primeros casos y donde llegó a ser la enfermedad transmitida por garrapatas con mayor incidencia en Estados Unidos.

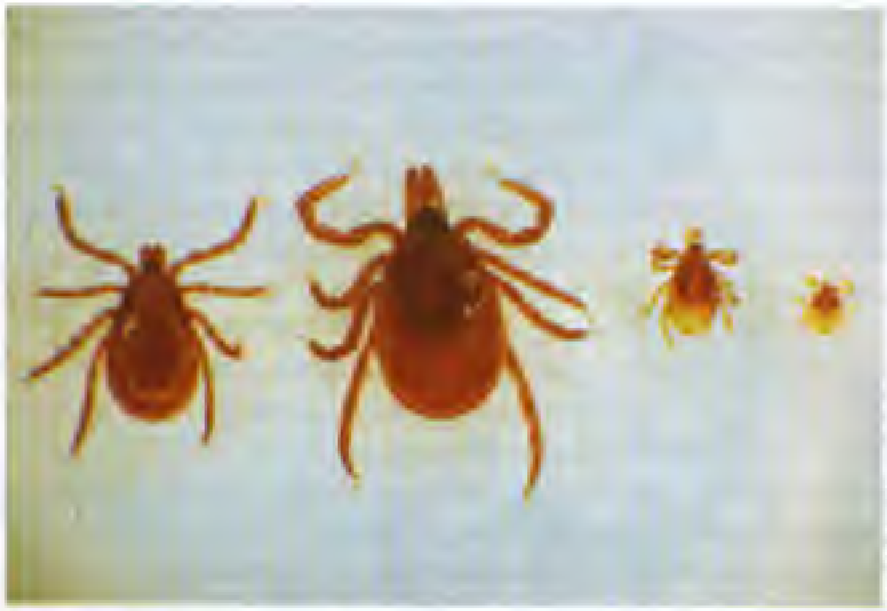
Biología y epidemiología

La enfermedad de Lyme es causada por una espiroqueta, *Borrelia burgdorferi* (*véanse* Figura 27.5 y Sección 12.34), la cual es transmitida principalmente por la garrapata del ciervo *Ixodes scapularis* (Figura 27.6). Las garrapatas que llevan las células de *B. burgdorferi* se alimentan de la sangre de pájaros, animales domésticos, diferentes animales salvajes y, ocasionalmente, del hombre; el ciervo y el ratón de patas blancas son los reservorios animales primarios de *B. burgdorferi* en la región del noreste de Estados Unidos. Sin embargo, en otras partes del país diferentes especies de ratones



Dario Corsin

Figura 27.5 Micrografía electrónica de la espiroqueta de Lyme, *Borrelia burgdorferi*. El diámetro de una célula es de alrededor de 0,4 µm.



Pfizer Research

Figura 27.6 Garrapatas del ciervo (*Ixodes scapularis*), los principales vectores de la enfermedad de Lyme. De izquierda a derecha, macho y hembra adultos, ninfas y forma larvaria. La longitud de una hembra adulta es de unos 3 mm. Todas las formas se alimentan de los humanos y son capaces de transmitir *Borrelia burgdorferi*.

y garrapatas están implicadas en la transmisión de la enfermedad de Lyme. En la zona oeste de Estados Unidos, *Ixodes pacificus* y la rata de la madera son potenciales vectores y hospedadores.

La enfermedad de Lyme ha sido también identificada en Europa y Asia. En Europa la garrapata vector es *Ixodes ricinus*, que también puede llevar *Borrelia garinii*, otro organismo que produce los síntomas de la enfermedad de Lyme. En los países asiáticos, *Borrelia afzelii* es transmitida por *Ixodes persulcatus* y produce la enfermedad de Lyme. En todos los casos, diferentes roedores locales has sido identificados como reservorios. Así, la enfermedad de Lyme parece tener una amplia distribución geográfica y es transmitida a los humanos por una gran variedad de especies relacionadas de *Borrelia*; diversos roedores actúan como reservorios y diferentes garrapatas como vectores.

La garrapata del ciervo y otros miembros del género son mucho menores que cualquier otro tipo de garrapata y por tanto es fácil que pase inadvertida (Figura 27.6). A diferencia de otras enfermedades transmitidas por garrapatas, un porcentaje muy alto (más del 50% en algunas regiones del noreste) de las garrapatas del ciervo portan células de *B. burgdorferi*. Un contacto tan extensivo con el vector aumenta mucho la probabilidad de la transmisión de la enfermedad.

En Estados Unidos, la mayoría de los casos de enfermedad de Lyme han sido registrados en el noreste y en la región central (MidWest), pero también se han observado casos en prácticamente todos los estados, y la enfermedad de Lyme se encuentra extendida por todo el país. La Figura 27.7 muestra la reciente expansión de la enfermedad de Lyme a través de todo Estados Unidos y el rápido aumento en el número total de casos.

Patogénesis

Las células de *Borrelia burgdorferi* se transmiten a los humanos mientras la garrapata se está alimentando de la sangre (Figura 27.8). Se desarrolla una infección sistémica, determinando los síntomas de la enfermedad de Lyme, que incluyen dolor de cabeza, dolor de espalda, escalofríos y fatiga. En alrededor del 75% de los casos, una extensa erupción, conocida como *eritema migrans* (eritema crónico migratorio) (*EM*), es observada en el sitio de la picadura (Figura 27.8). En este momento, la enfermedad de Lyme se puede tratar con tetraciclina o penicilina. La enfermedad no tratada puede progresar a un estado crónico después de algunas semanas o meses de la picadura inicial. La enfermedad de Lyme crónica se caracteriza por una artritis en el 40 a 60% de los casos. También aparecen afectaciones neurológicas como debilidad en las extremidades y «tics» faciales en un 15 a 20% de los casos. Alteraciones cardiacas ocurren en el 8% del total. El tratamiento del estadio crónico generalmente requiere antibióticos intravenosos. El fármaco ceftriaxona, un antibiótico β-lactámico, es muy activo y se usa para el tratamiento de la infección crónica, ya que es uno de los pocos antibióticos capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y atacar las espiroquetas residentes en el sistema nervioso central. Si no se sigue tratamiento alguno, las células de *B. burgdorferi* que infectan el sistema nervioso central pueden entrar en estado de latencia durante largos periodos de tiempo y después producir gran variedad de complicaciones crónicas adicionales, como alteraciones visuales, parálisis facial y ataques.

No se han identificado hasta la fecha toxinas u otros factores de virulencia en la patogénesis de la enfermedad de Lyme. En muchos aspectos los síntomas de la enfermedad de Lyme latente se parecen a los de la sífilis, causada por otra espiroqueta, *Treponema pallidum*. Además, algunos de los síntomas neurológicos de la enfermedad de Lyme se parecen a los de la sífilis crónica (Sección 26.12). No obstante, a diferencia de la sífilis, la enfermedad de Lyme no se transmite a través de relaciones sexuales u otros tipos de contacto entre personas. Pequeñas cantidades de células de *B. burgdorferi* han sido detectadas en la orina de individuos

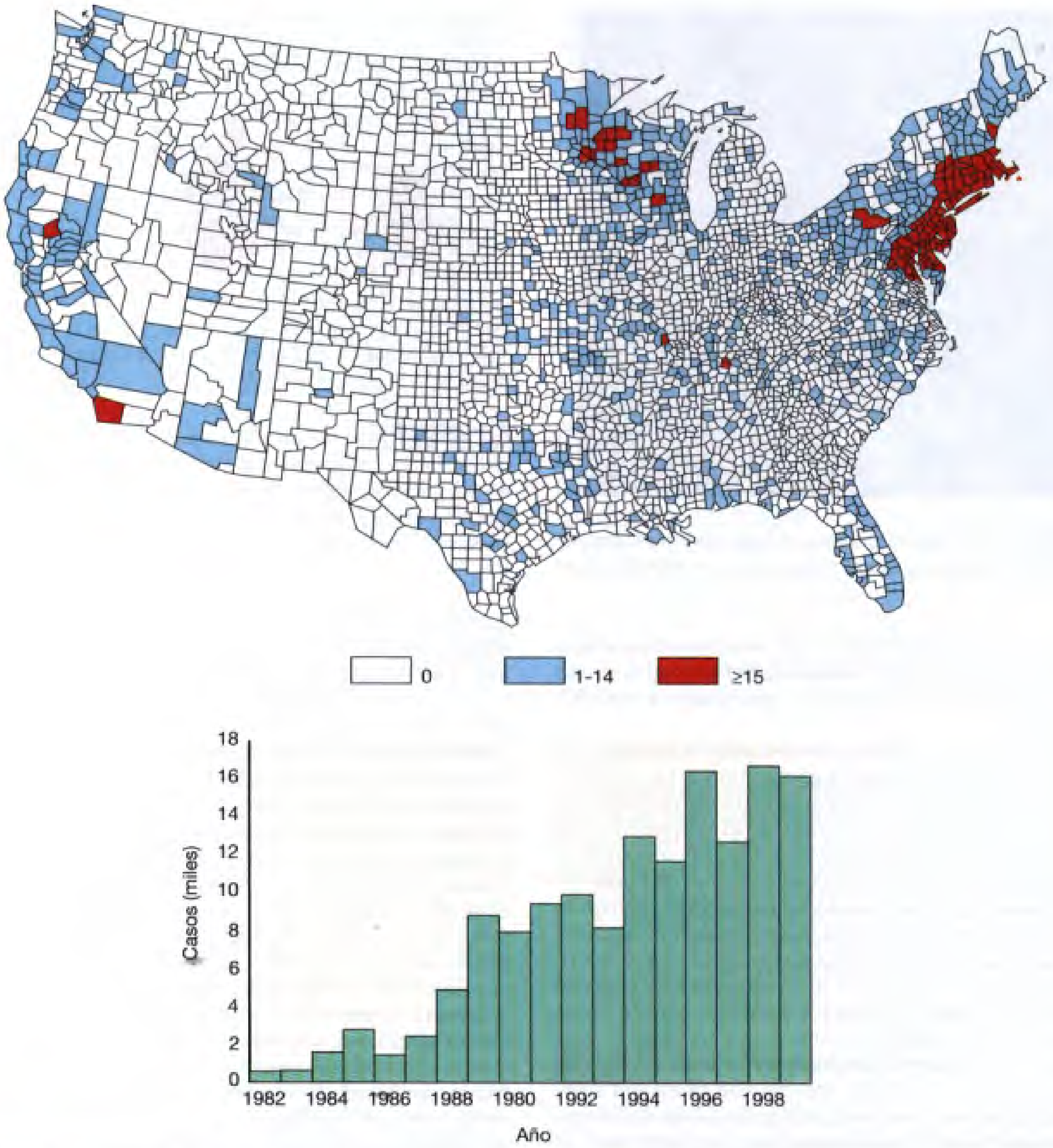
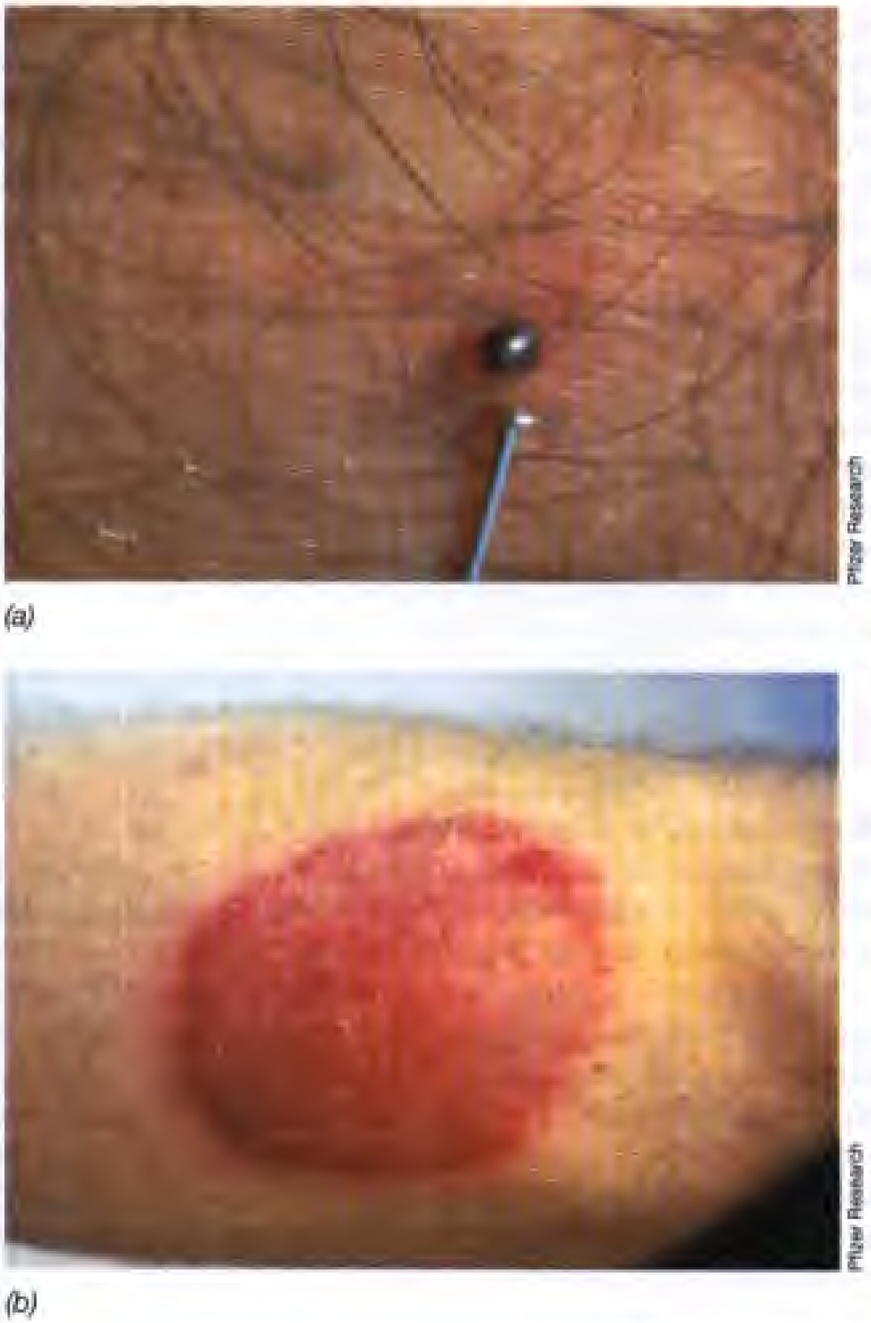


Figura 27.7 Enfermedad de Lyme en Estados Unidos. (a) Incidencia de la enfermedad de Lyme en Estados Unidos en 1999. Cada condado que registró casos en 1999 se encuentra sombreado; condados con más de 15 casos aparecen en negro. La enfermedad de Lyme se encontró a lo largo de todo Estados Unidos aunque su incidencia fue mayor en el noreste y en la parte superior del medio oeste. (b) Número de casos registrados de enfermedad de Lyme por año en Estados Unidos. La enfermedad de Lyme es registrada a través del Sistema Nacional de Vigilancia de Enfermedades perteneciente a los Centros de Control y Prevención de Enfermedades.

infectados y hay algunas datos que indican que esta enfermedad se puede extender a partir de los animales domésticos, particularmente el ganado, y a través de la orina.

Tratamiento y prevención

Se han desarrollado pruebas serológicas para la detección de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi*. Los anticuerpos aparecen alrededor de 4 a 6 semanas después de la infección y pueden detectarse mediante ensayos del tipo de ELISA o por ensayos con anticuerpos fluorescentes (*véanse* Secciones 24.10 y 24.11). Sin embargo, la más definitiva de las pruebas serológicas es la inmunotransferencia (*Western blot*) (*véase* Sección 24.12). Desafortunadamente, los anticuerpos frente a los antígenos de la espiroqueta de la enfermedad de



Pfizer Research

Pfizer Research

Figura 27.8 (a) Pulga del ciervo alimentándose de la sangre de un humano. (b) Erupción circular característica asociada a la enfermedad de Lyme. La erupción conocida como *eritema migrans* (EM) (eritema crónico migratorio), comienza en el sitio de la picadura y crece centrífugamente de forma circular durante varios días. Este ejemplo típico mide alrededor de 5 cm de diámetro.

Lyme persisten durante varios años después de la infección, y la presencia de anticuerpos no confiere necesariamente inmunidad frente a la enfermedad.

Un ensayo de reacción de cadena de la polimerasa (PCR) (*véase* Sección 24.13) también ha sido desarrollado para la detección de *Borrelia burgdorferi* a partir de fluidos y tejidos. Mientras que los anteriores son rápidos y sensibles, los métodos de PCR no son capaces de diferenciar entre las células vivas de *B. burgdorferi* durante una infección activa, y las células muertas o inactivas de una infección tratada o latente.

B. burgdorferi puede ser cultivada a partir de casi el 80% de las lesiones de *eritema migrans*, pero generalmente no se hace debido al largo tiempo de latencia del organismo hasta que crece en el medio de cultivo.

En definitiva, la enfermedad de Lyme se diagnostica habitualmente por su sintomatología clínica: si un paciente tiene los síntomas de la enfermedad de Lyme y ha estado expuesto recientemente a la picadura de una garrapata, especialmente si la picadura muestra el *eritema* migrans, se hace un diagnóstico presuntivo de enfermedad de Lyme y se inicia el tratamiento con antibióticos.

La prevención de la enfermedad de Lyme requiere precauciones apropiadas para evitar la picadura de las garrapatas. En áreas infestadas de garrapatas como bosques, zonas con matorrales, etc., se aconseja llevar ropa protectora como calzado, pantalones largos, camiseta de manga larga con cuello ajustado y puños. Los extremos de los pantalones introducidos en los calcetines junto con botas son una efectiva barrera para las picaduras. Después de estar en una zona infestada de garrapatas se debe comprobar cuidadosamente la presencia de las mismas unidas al cuerpo y eliminarlas (incluyendo la cabeza). Repelentes de insectos que contengan dietil-*m*-toluamida (DEET) son muy efectivos cuando se aplican tanto en la piel como en la ropa.

Se dispone de una vacuna efectiva frente a la enfermedad de Lyme, que se recomienda a individuos que por su profesión o sus actividades deportivas o recreativas estén expuestos a las garrapatas o a sus hábitat. Esta vacuna, que confiere una alta protección (más del 90%), consiste en una proteína antigénica de la superficie de *B. burgdorferi* (OspA) que se expresa en *Escherichia coli* por un gen recombinante conseguido mediante ingeniería genética (*véanse* Sección 31.6 y 22.11)

✓ 27.4 Revisión de conceptos

La enfermedad de Lyme es actualmente la que mayor incidencia tiene en Estados Unidos entre las enfermedades transmitidas por artrópodos. Se transmite desde diferentes hospedadores mamíferos a los humanos a través de las garrapatas. La prevención y el tratamiento de la enfermedad de Lyme es sencilla, pero no así su diagnóstico.

✓ ¿Cuáles son los síntomas primarios de la enfermedad de Lyme?

✓ ¿Qué antibióticos pueden emplearse en el tratamiento de la enfermedad de Lyme?

27.5 Malaria

La malaria es la enfermedad causada por un protozoo, un miembro del grupo de los Sporozoa. Ya explicamos los Sporozoa como grupo en la Sección 14.6. El parásito de la malaria es uno de los patógenos humanos más importantes y ha jugado un papel extremadamente importante en el desarrollo y extensión de la cultura humana. Además, como veremos, la malaria ha afectado incluso a la evolución humana. La malaria es todavía una enfermedad humana significativa incluso aunque existen diferentes tratamientos efectivos disponibles: hay alrededor de 100 millones de personas en todo el mundo que ahora tienen malaria y, cada año, alrededor de un millón de ellos muere (*véase* Sección 25.1).

Epidemiología y patogénesis

El principal reservorio entre los mamíferos de la malaria son los humanos. Cuatro especies de esporozoos infectan a los humanos, de los cuales el más extendido es *Plasmodium vivax* y el más importante, *Plasmodium falciparum*. Este parásito eucariótico desarrolla parte de su ciclo de vida en los humanos, y parte en un mosquito que actúa como vector extendiendo el parásito de persona a persona (*véase* Sección 14.9). Solamente las hembras de los mosquitos del género *Anopholes* transmiten la malaria. Los mosquitos *Anopholes* habitan primariamente en zonas templadas del planeta y, por tanto, la malaria aparece predominantemente en los trópicos y subtrópicos. La malaria no existía en las regiones del norte de Norte América antes del asentamiento de los europeos, pero es un gran problema en el sur, donde existen apropiadas áreas para el crecimiento del mosquito. La enfermedad está asociada con zonas bajas y pantanosas, y el nombre de malaria provienen de las palabras italianas *mal aire*.

El ciclo de vida del parásito de la malaria es complejo (Figura 27.9). Primero, el hospedador humano es infectado por *esporocitos* del plasmodio, células pequeñas y alargadas que se producen en el mosquito, y que se localizan en las glándulas salivares del insecto. El mosquito inyecta saliva (que contiene un anticoagulante) junto con los esporocitos. Los esporocitos viajan a través del torrente sanguíneo hasta el hígado, donde pueden quedar de forma quiescente, o crecer y replicarse dando lugar a una fase conocida como *esquizonte*. Los esquizontes se segmentan en un gran número de pequeñas células llamadas *merozoitos*; estas células se liberan del hígado en el torrente sanguíneo. Algunos de los merozoitos infectan los glóbulos rojos. El ciclo en los eritrocitos procede como en el hígado y habitualmente se repite en ciclos de 48 horas en el caso de *P. vivax*. Es durante este periodo cuando aparecen los síntomas de la malaria, caracterizados por fiebre de más de 40°C (104°F) seguida de escalofríos. Los escalofríos tienen lugar cuando una nueva generación de *P. vivax* es liberada de los eritrocitos. Vómitos y fuerte dolor de cabeza pueden acompañar los ciclos de fiebre-escalofríos, y periodos asintomáticos alternan con otros en los que los síntomas típicos se presentan. Debido a la pérdida de glóbulos rojos, la malaria causa anemia y agrandamiento del bazo.

No todos los protozoos liberados de los eritrocitos son capaces de infectar otros glóbulos rojos, a aquéllos que no son capaces se les conoce como *gametocitos*, y son infectivos exclusivamente para el mosquito. Estos gametocitos son ingeridos cuando otro *Anopheles* pica a la persona infectada y maduran en el mosquito produciendo *gametos*. Dos gametos se fusionan dando lugar a un zigoto; el zigoto migra gracias a movimientos ameboides a la placa externa del intestino del mosquito donde se agranda y forma gran cantidad de esporocitos. Éstos son liberados y algunos llegan a las glándulas salivares desde donde pueden ser inoculados a otra persona, comenzando el ciclo de nuevo.

Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico definitivo de la malaria en humanos requiere la identificación de eritrocitos infectados por *Plasmodium* en muestras de sangre (Figura 27.10).

La profilaxis (cuando se viaja a áreas endémicas) y el tratamiento de la malaria se hace mediante *cloroquina*. La cloroquina es el fármaco de elección para tratar los parásitos en los eritrocitos, pero no los mata cuando éstos están fuera de las células. El fármaco relacionado llamado *primaquina* elimina los esporocitos, merozoitos y gametos fuera de las células. El tratamiento con ambos, cloraquina y pri-

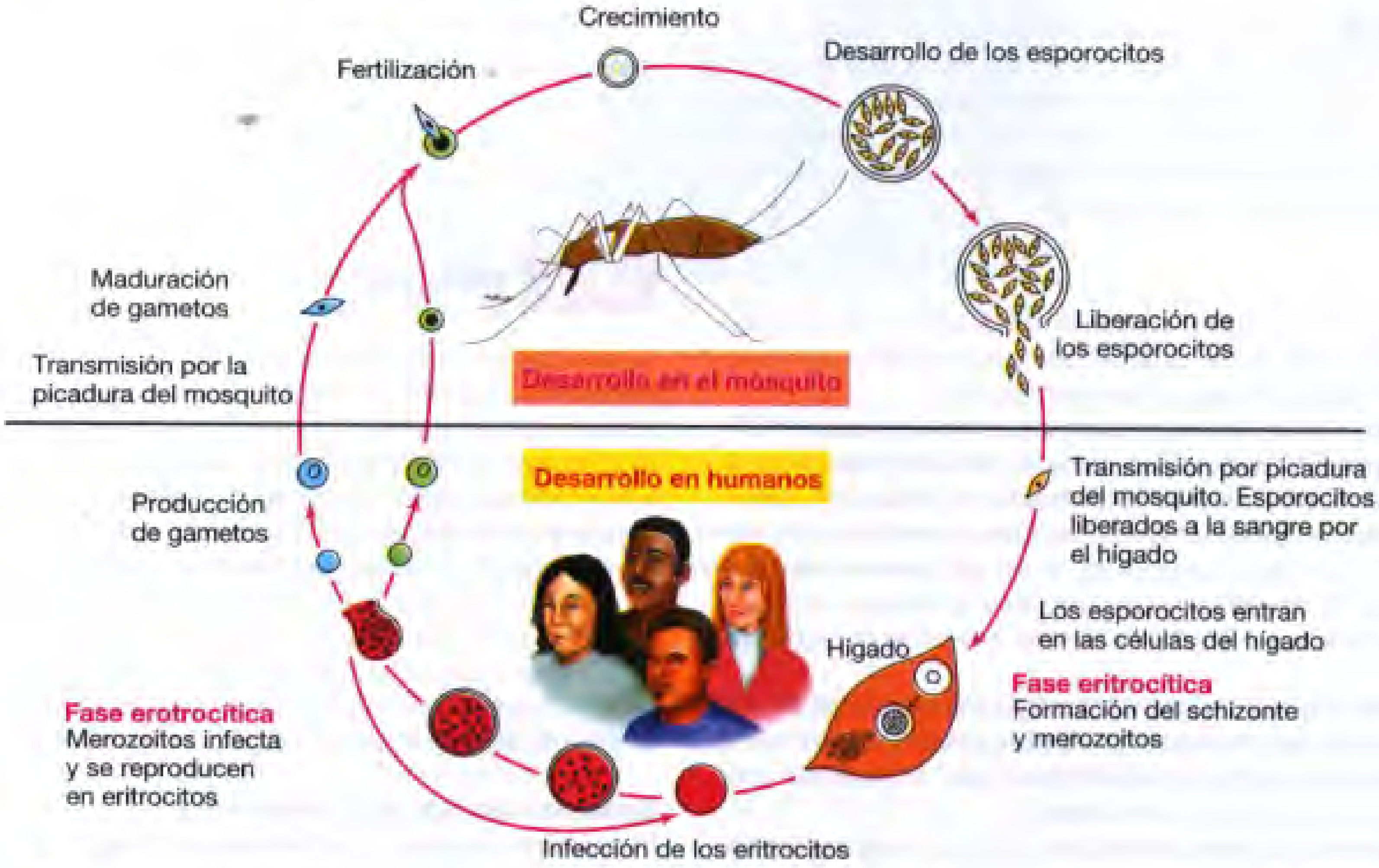

Crecimiento
Fertilización
Desarrollo de los esporocitos
Maduración de gametos
Transmisión por la picadura del mosquito
Desarrollo en el mosquito
Liberación de los esporocitos
Desarrollo en humanos
Producción de gametos
Transmisión por picadura del mosquito. Esporocitos liberados a la sangre por el higado
Los esporocitos entran en las células del hígado
Higado
Fase eritrocítica
Formación del schizonte y merozoitos
Fase erotrocítica
Merozoitos infecta y se reproducen en eritrocitos
Infección de los eritrocitos

Figura 27.9 Ciclo de vida del parásito de la malaria, *Plasmodium vivax*.

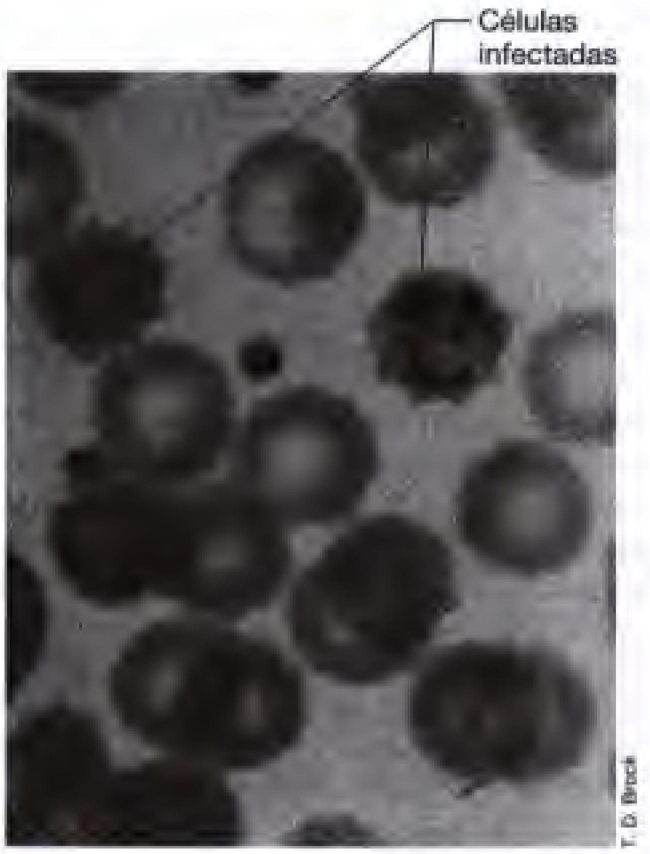


Figura 27.10 *Plasmodium vivax*, el agente etiológico de la malaria, creciendo dentro de eritrocitos humanos.

maquina, produce la cura de la infección. Sin embargo, en individuos que han seguido el tratamiento con ambos fármacos, la malaria puede recurrir varios años después de la infección primaria. Aparentemente un pequeño número de esporocitos sobrevive en el hígado y reinicia la infección meses o años después mediante la liberación de nuevos merozoitos.

Además, en muchas partes del mundo las cepas de *Plasmodium* han desarrollado resistencias a la cloraquina o primaquina, o a ambas, incluso hay cepas que han desarrollado resistencias a otros fármacos. En zonas de reconocidas resistencias está Melarona^{TM}, una combinación de atovaquona y proguanil, recomendado tanto para la profilaxis como para el tratamiento.

Prevención y erradicación

El tratamiento con medicamentos antimalaria es una solución muy cara y de poca duración, lo que además se complica sobremanera por la aparición de cepas resistentes a los fármacos empleados. La más eficaz medida de control se realiza mediante la ruptura del ciclo de vida del parásito eliminado uno de los hospedadores, el mosquito *Anopheles*.

Son posibles dos aproximaciones para el control del mosquito: (1) eliminación del hábitat por drenaje de los pantanos y áreas similares; (2) eliminación del mosquito mediante insecticidas y tratamiento de los pacientes con primaquina, para romper el ciclo de vida de *Plasmodium*. Durante los años treinta, alrededor de 33 000 millas de acequias fueron excavadas en 16 estados del sur, eliminando 544 000 acres de áreas de hábitat del mosquito. Millones de galones de aceite fueron también extendidos en los pantanos para reducir la cantidad de oxígeno necesaria para las larvas. Con el descubrimiento del insecticida diclorodifeniltricloroetano (DTT) (Figura 19.49), fue posible el control químico tanto de la larva como del mosquito. Durante la Segunda Guerra Mundial, el Servicio de Salud Publica organizó una Oficina de Control del Mosquito en Áreas de Guerra y, dado que muchas bases militares estaban en los estados del sur, esta organización llevó a cabo una extensiva erradicación en Estados Unidos y en las zonas de ultramar. En 1946, un año en el que hubo 48 610 casos de malaria en Estados Unidos, el Congreso estableció un programa de erradicación de la malaria de cinco años de duración. En áreas endémicas el programa incluía profilaxis y regímenes de tratamiento para las personas, además de tratamiento con DTT para la eliminación del mosquito. En 1953 solo hubo 1310 casos de malaria; en 1935 hubo alrededor de 4000 muertes por malaria; en 1952 sólo hubo 25 muertes. Así pues, el miedo a la malaria, actualmente, en Estados Unidos es mínimo. No obstante, la malaria *endémica* ha aparecido en los últimos años, aunque con muy pocos casos, incluso muy al norte, como en Nueva York. El incremento en los casos de malaria puede ser debido a la malaria importada por soldados o inmigrantes que vienen de áreas endémicas (Figura 27.11) pero hay, de promedio, menos de una muerte anual debida a la malaria en Estados Unidos.

En otras partes del mundo, la erradicación ha sido mucho más lenta, pero las mismas medidas de control han sido tomadas y son aún efectivas. La reducción del hábitat del mosquito, el control de los mosquitos con insecticidas (el DTT ya no se emplea debido a los problemas ambientales que genera, pero otros insecticidas muy efectivos están disponibles) y el tratamiento de individuos infectados con medicamentos tanto para la cura como para la profilaxis, son las principales estrategias seguidas para el control de la malaria. Adicionalmente, diferentes vacunas profilácticas experimentales se encuentran actualmente en fase de ensayos clínicos.

La malaria y la evolución bioquímica de los humanos

La malaria ha sido, indudablemente, endémica en África durante miles de años. En habitantes de África del oeste, la re-

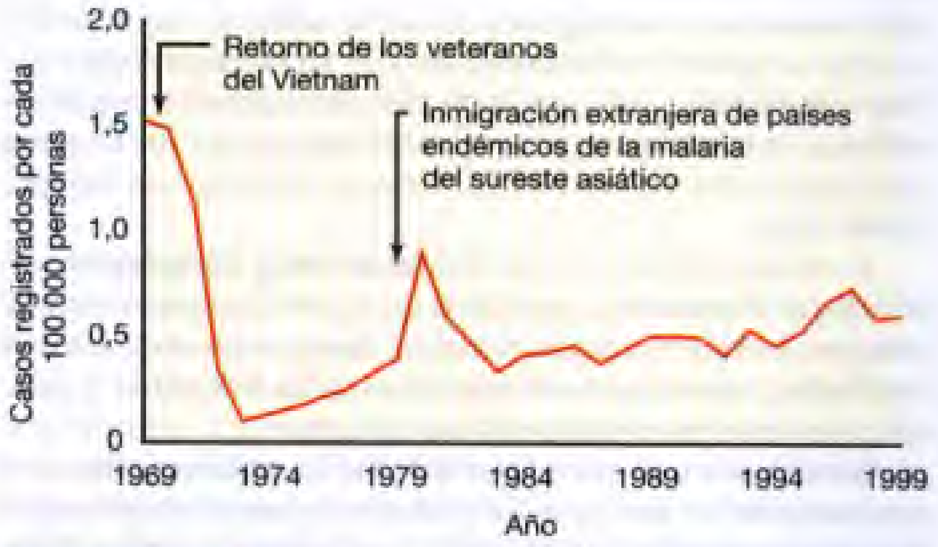


Figura 27.11 Incidencia de la malaria en Estados Unidos. Hay actualmente alrededor de 1000 casos de malaria por año. Casi todos son importados, con sólo unos pocos casos de áreas endémicas. Antes de 1947, había al menos 48 000 casos por año, la mayoría de áreas endémicas. Los datos provienen de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades, Atlanta, GA, EE.UU.

sistencia a la malaria producida por *Plasmodium falciparum* se asocia con la alteración de una proteína de los glóbulos rojos, la hemoglobina S, donde el aminoácido neutro *valina* es sustituido por el *ácido glutámico* de la hemoglobina A. La hemoglobina S une oxígeno menos eficientemente que la hemoglobina A. Bajo condiciones de baja concentración de oxígeno, la hemoglobina S forma agregados largos y delgados que hacen que los glóbulos rojos cambien de su forma redondeada bicóncava (Figura 22.4) a una forma alargada de C. Debido a la forma de la célula, esta condición se conoce como *célula hoz*. Individuos homocigóticos para el fenotipo de células hoz son particularmente susceptibles a los cambios en la concentración de oxígeno y sufren de anemia falciforme.

Los individuos heterocigóticos para la hemoglobina S tienen el fenotipo de células hoz y una incrementada resistencia a la malaria. Estas personas a pesar de tener las células en forma de hoz, no muestran los problemas de transporte de oxígeno que tienen los homocigóticos. Sin embargo, el crecimiento de *P. falciparum* en el interior de los eritrocitos produce que las células de los individuos heterocigóticos manifiesten el fenotipo de hoz más fácilmente que las células no infectadas. La agregación de la hemoglobina S en el interior de los eritrocitos, aparentemente, rompe la membrana de las células permitiendo que el potasio difunda al medio. *P. falciparum* no puede crecer en el medio pobre en potasio que es ahora el eritrocito con su membrana alterada. Así pues, la personas con eritrocitos en forma de hoz son resistentes a la malaria.

En ciertas regiones mediterráneas donde la malaria es endémica, la resistencia a *P. falciparum* es asociada a una deficiencia en los glóbulos rojos de una enzima llamada glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), una enzima que actúa como un componente antioxidante intracelular (reduciendo). La falta de G6PD determina altos niveles de oxidantes intracelulares tales como H2O2 (realmente producido dentro del glóbulo rojo por el crecimiento de *P. falciparum*). Los altos niveles de oxidantes dañan las membranas del parásito y limitan el crecimiento del mismo.

En muchas poblaciones mediterráneas, un diverso grupo de anormalidades genéticas afectan a la producción y eficiencia de la hemoglobina. Todas ellas son conocidas colectivamente como **talasemias**. Las talasemias están también estadística y geográficamente relacionadas con la resistencia a la malaria y, como la deficiencia de G6PD, están asociadas a niveles reducidos de antioxidantes en los glóbulos rojos.

La hemoglobina S, la deficiencia de G6PD y las talasemias son mutaciones genéticas que parecen conferir resistencia a la infección por malaria, aunque las mutaciones también confieren anormalidades en los linfocitos y deficiencias en el procesamiento de oxígeno.

Otro caso en el que el parásito de la malaria influenció en la evolución está relacionado con el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y el sistema inmunitario (*véanse* Secciones 23.2 y 23.3). Como se discutió previamente, las proteínas del MHC de clase I y de clase II presentan antígenos a los linfocitos T en el inicio de la respuesta inmunitaria. En zonas del oeste de África donde hay malaria, los individuos poseen un tipo particular de MHC de clase I y de clase II. Estos particulares tipos de MHC seleccionados son prácticamente desconocidos fuera de esta zona de África. Los individuos que expresan estos genes disponen de mucha mayor resistencia a las manifestaciones severas o mortales de la malaria, incluso, que aquéllos que tienen hemoglobina S. Estas particulares proteínas del MHC son excepcionalmente buenas presentadoras de antígeno para ciertos antígenos de la malaria, confiriendo una protectiva resistencia a la infección por *Pasmodium* sp. como resultado de la poderosa respuesta inmunitaria que inician.

Al igual que las variantes de la hemoglobina, el parásito funciona como un poderoso agente de selección de genes individuales importantes para la supervivencia del hospedador: individuos con genes particulares del MHC tienen una ventaja en cuanto a supervivencia y, por tanto, más posibilidades de reproducción y de pasar los genes que confieren la resistencia a su progenie.

Así, diferentes evidencias indican que la malaria ha sido un agente de selección en la evolución humana. Otros patógenos, tales como *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculosis, Sección 27.6) y *Yersinia pestis* pueden, también, haber producidos cambios evolutivos en los humanos, pero en ningún caso las evidencias son tan claras como lo son en el de la malaria.

✓ 27.5 Revisión de conceptos

La malaria es una enfermedad infecciosa transmitida por un mosquito, ampliamente extendida pero principalmente afectando a las regiones tropicales y subtropicales del planeta. Es la mayor causa de morbilidad y mortalidad en los países en desarrollo y ha sido un factor de selección para diferentes genes de resistencia. La enfermedad se puede prevenir con una combinación de medidas tanto de salud pública como quimioterapéuticas.

- ✓ ¿Cómo se puede prevenir la malaria?
- ✓ Resuma los mecanismos genéticos responsables de la resistencia a la malaria. ¿Por qué no se encuentran genes antimalaria en todos los humanos?
- ✓ ¿Cuál es el reservorio natural de *Plasmodium* sp.?

27.6 La peste

Las pandemias de peste han sido más directamente responsables del mayor número de muertes que cualquier otra enfermedad infecciosa en el hombre, con excepción de la malaria y la tuberculosis. La peste mató entre el 25 y el 33% de la población europea en las epidemias de la Edad Media.

Biología y epidemiología

La peste es causada por *Yersinia pestis*, bacteria Gram negativa, con forma de varilla, aeróbica facultativa y del grupo de las enterobacterias (*véase* Sección 12.11). La peste es una enfermedad propia de los roedores tanto salvajes como domésticos; las ratas son el reservorio primario de la enfermedad. Los humanos son hospedadores accidentales y no son críticos para el mantenimiento de la enfermedad. Los hospedadores intermediarios son las pulgas, las cuales, además, actúan como vectores, extendiendo la peste entre los distintos mamíferos hospedadores (Figura 27.12). La mayoría de las ratas infectadas mueren antes de que aparezcan los sín-

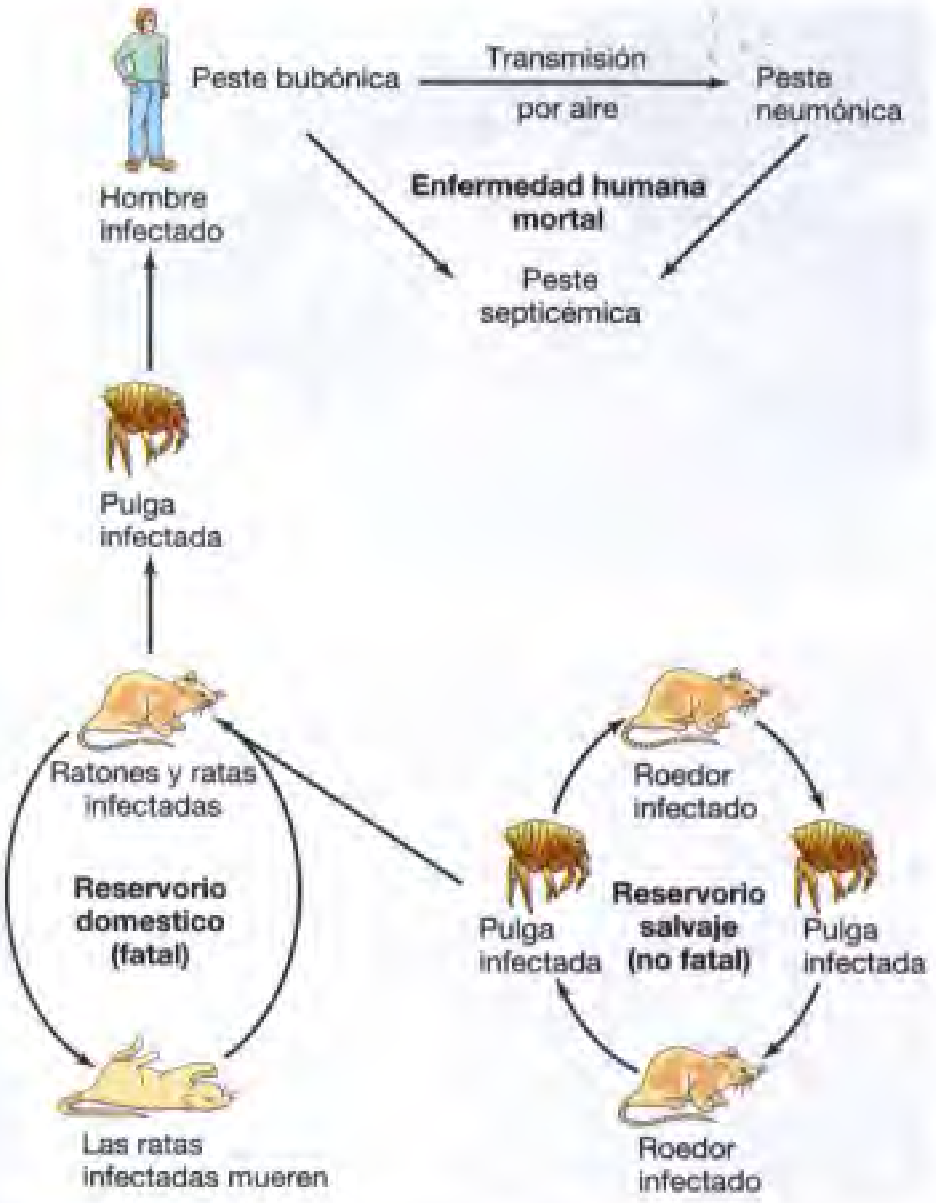


Figura 27.12 La epidemiología de la peste debida a *Yersinia pestis*. La peste en la mayoría de los roedores salvajes es una infección ligera. La peste en ratas y en humanos es frecuentemente mortal. Pulgas infectadas abandonan el hospedador muerto en busca de otros, como los humanos, un hospedador accidental.

tomas, pero una baja proporción desarrolla una infección crónica que sirve como fuente de virulentas *Y. pestis*. La mayoría de los casos de peste en humanos en Estados Unidos ocurrió en los estados del suroeste, donde la enfermedad es endémica entre los roedores salvajes (peste selvática)

La peste es transmitida por la pulga de la rata (*Xenopsylla cheopis*), la cual ingiere *Y. pestis* al alimentarse de la sangre de animales infectados. Las células se multiplican en el intestino de la pulga y pueden ser transmitidas a otro animal en la siguiente picadura. De acuerdo a la extensión de la infección, la mortalidad entre las ratas se hace enorme y las pulgas infectadas buscan nuevos hospedadores, incluyendo a los humanos. Una vez en los humanos, las células de *Y. pestis* viajan a los nódulos linfáticos, donde causan la formación de áreas hinchadas conocidas como *bubones*. Por esta razón la enfermedad es muchas veces conocida como *peste bubónica* (Figura 27.13*a*). Los bubones se llenan de células de *Y. pestis*, las cuales no son fagocitadas por los macrófagos gracias a la cápsula que forman (*véase* Sección 22.2). Los bubones secundarios se forman en los nódulos linfáticos periféricos, y las células eventualmente entran en el torrente sanguíneo, causando una septicemia general. Múltiples hemorragias producen los típicos parches negros en la piel, lo que le dio a la peste el histórico sobrenombre de «la muerte negra» (Figura 27.13*b*). Si no es tratada antes de la fase septicémica, los síntomas de la peste, incluyendo el fortísimo dolor de los nódulos linfáticos, la postración, el shock o delirio, progresa y habitualmente causa la muerte en 3 a 5 días.

Patogenia

La patogenia de la peste no es claramente conocida, las células de *Yersinia pestis* producen un número de moléculas antigénicamente diferentes, incluyendo toxinas que indudablemente contribuyen en el proceso de la enfermedad. Los antígenos V y W de la pared de *Y. pestis* son complejos proteína-lipoproteína que inhiben la fagocitosis. Otras proteínas de la envuelta también están presentes. Una exotoxina llamada *toxina murina*, debido a su extrema toxicidad en los ratones, es producida por cepas virulentas de *Y. pestis*. La toxina murina es un inhibidor respiratorio que bloquea el transporte de electrones en la mitocondria en el punto de la coenzima Q (Sección 5.12). Aunque no está claro que la coenzima Q esté involucrada en la patogénesis de la peste en humanos (la toxina murina es muy tóxica para unos animales pero no para otros), produce shock sistémico, daño en el hígado y angustia respiratoria en ratones. Todos estos síntomas son observados también en la peste humana. *Y. pestis* también produce una endotoxina altamente inmunogénica que puede también jugar algún papel en el desarrollo de la enfermedad.

Otras formas de peste

La *peste neumónica* ocurre cuando *Yersinia pestis* es inhalada directamente o alcanza los pulmones durante la peste bubónica (Figura 27.13*c*). Los síntomas no se hacen patentes hasta el último o los dos días últimos de la infección, cuando se emiten gran cantidad de esputos sanguinolentos. Los individuos no tratados apenas sobreviven más de dos días. La peste neumónica es altamente contagiosa y puede transmitirse rápidamente de persona a persona por la ruta respiratoria si los individuos afectados no son inmediatamente puestos en cuarentena. La *peste septicémica* implica el rápido esparcimiento de *Y. pestis* por todo el cuerpo a través del torrente sanguíneo, sin la formación de bubones y causando la muerte generalmente antes de poder ser diagnosticada.

Tratamiento y control

La peste se puede tratar con éxito si se diagnostica rápidamente. La infección de *Yersinia pestis* se trata con streptomicina y alternativamente con tetraciclina. A los individuos expuestos a la peste neumónica, la tetraciclina se recomienda como profilaxis. Si el tratamiento se inicia rápidamente, la mortalidad por peste bubónica se puede reducir hasta un 1 a 5% de los infectados. La peste neumónica y septicémica también pueden ser tratadas, pero estas formas progresan tan rápidamente que la terapia con antibióticos, incluso si es comenzada cuando los síntomas aparecen, es demasiado lenta. Aunque potencialmente nos encontramos ante una enfermedad devastadora, en la última década sólo hubo 89 casos de peste en Estados Unidos (Figura 27.14). Desgra-

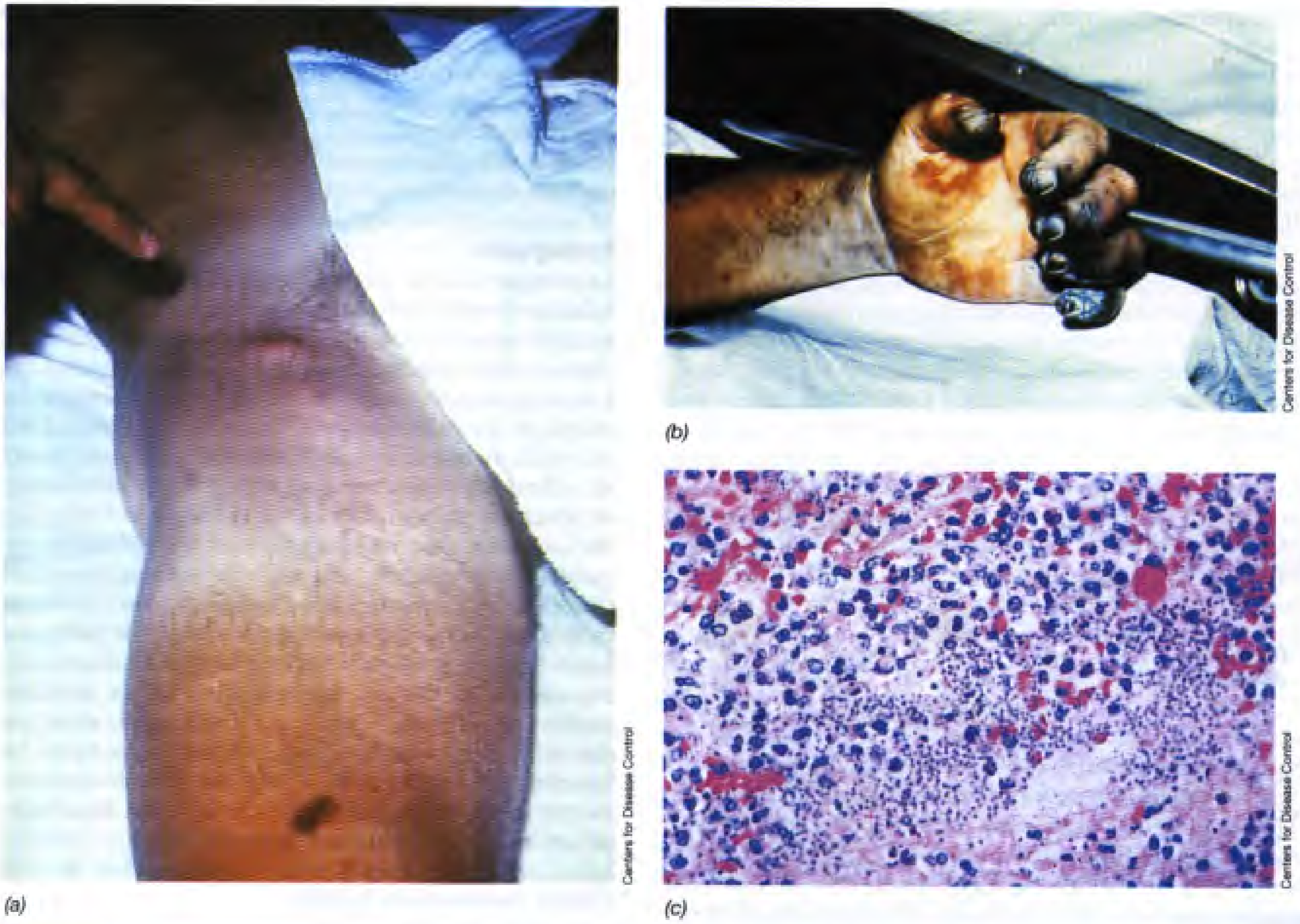

(a)
(b)
(c)
Centers for Disease Control
Centers for Disease Control
Centers for Disease Control

Figura 27.13 Peste en humanos. (a) Bulbo formado en la ingle. (b) Gangrena y manchas de la piel en la mano. (c) *Yersinia pestis*, el agente causante de la peste. Las células se muestran como células muy pequeñas y azules en el tejido pulmonar de una víctima de peste neumónica.

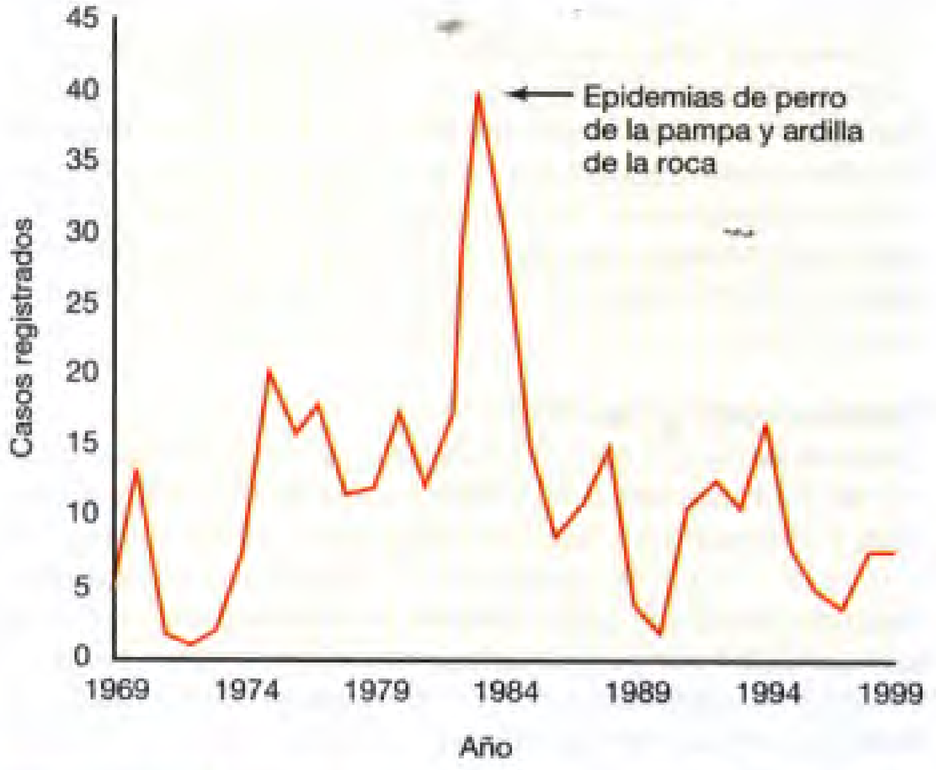


Figura 27.14 Peste en Estados Unidos. Desde 1990 a 1999, sólo 89 casos y 8 muertes han sido registradas. Los datos son de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades Infecciosas (CDC), Atlanta, EE.UU.

ciadamente 8 murieron (índice de mortalidad del 9%). En todo el mundo hay menos de 1500 casos confirmados y menos de 300 muertes por año.

El control de la peste pasa por la vigilancia de animales infectados, vectores y contactos con humanos. Las poblaciones de animales infectados por la peste deben ser destruidas cuando aparezcan. Sin duda, prácticas de salud pública mejoradas y sobre todo el control de los roedores han limitado la exposición humana a la peste. La prevención debe venir acompañada por la inmunización con una vacuna muerta con formalina, pero debido a que la incidencia es muy baja, la inmunización sólo se recomienda en individuos con alto riesgo de exposición.

✓ 27.6 Revisión de conceptos

La peste está muy confinada en individuos que están en contacto con poblaciones de roedores que son reservorios endémicos de *Yersinia pestis*. Una infección diseminada de forma sistémica a menudo determina la muerte inmediata, pero las infecciones localizadas se pueden tratar con antibióticos.

- ✓ Distinga entre peste bubónica, septicémica y neumónica.
- ✓ ¿Cuál es el insecto reservorio, el hospedador natural y el tratamiento de la peste?

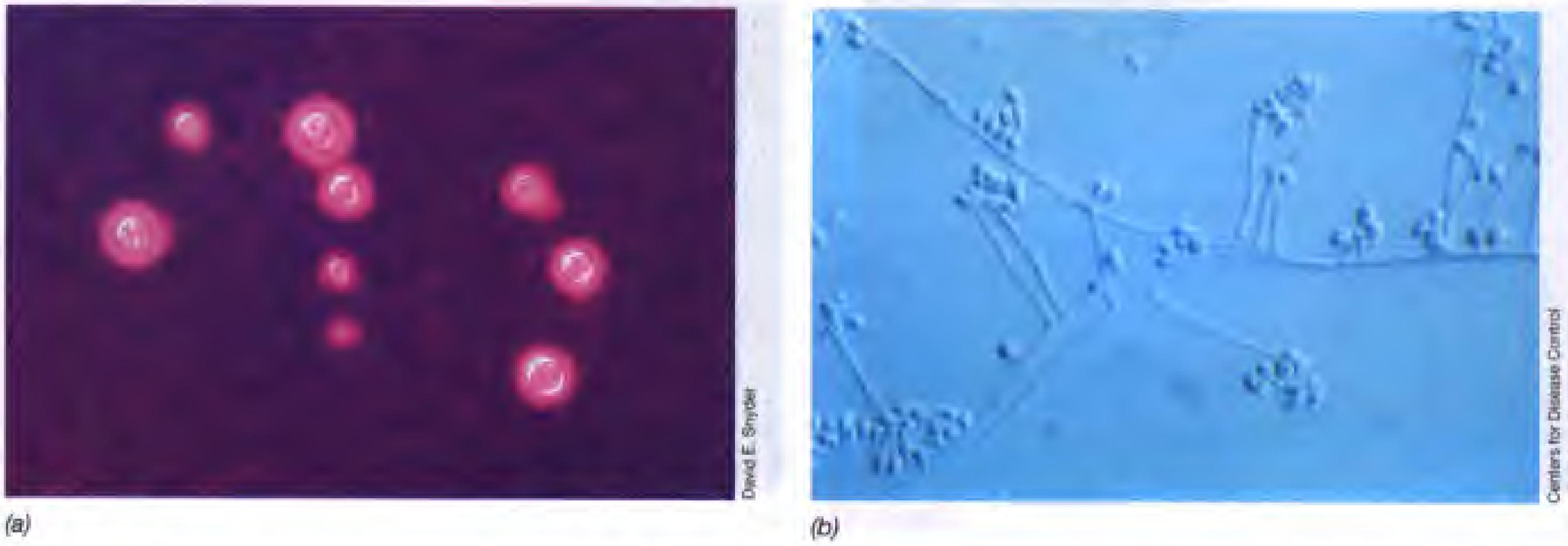


Figura 27.15 Formas típicas de hongos patógenos. (a) Forma de levadura de *Cryptococcus neoformans*, teñido con tinta india para mostrar la cápsula. Las células son de entre 4 y 20 micras. (b) *Sporothrix schenckii*, mostrando la morfología filamentosa ramificada propia de la forma de moho de los hongos. Las basidioesporas redondas son de alrededor de 2 micras de diámetro.

III ENFERMEDADES TRANSMITIDAS A PARTIR DEL SUELO

Vamos a tratar en este capítulo las enfermedades que normalmente se transmiten a partir del suelo. Los hongos son microorganismos ubicuos en los suelos de todo el mundo, y algunos de ellos pueden comportarse como patógenos. Algunas bacterias también son patógenos importantes transmitidos a través del suelo. A diferencia de los patógenos transmitidos de persona a persona o a través de vectores, los patógenos transmitidos por el suelo son patógenos accidentales con un ciclo de vida independiente del hospedador accidental. Hay que tener en cuenta que el suelo es un reservorio ilimitado de patógenos y que estos patógenos no pueden ser eliminados debido a lo vasto de su reservorio.

27.7 Los hongos patógenos

Muchos hongos se encuentran en la naturaleza como saprofitos de vida libre. Entre ellos hay unos pocos que ocasionalmente actúan como patógenos ocasionales y a menudo oportunistas.

Biología y epidemiología

Los hongos crecen bajo diferentes morfologías y prácticamente en todos los nichos ecológicos, pero son particularmente frecuentes en los materiales en descomposición del suelo. En los hongos se incluyen los organismos eucarióticos comúnmente conocidos como *levaduras*, que normalmente crecen como células individuales (Figura 27.15*a*), y los *mohos* que normalmente crecen en forma de cadenas ramificadas llamadas *hifas* (Figura 27.15*b*). La taxonomía y diversidad biológica de estos organismos ya han sido abordadas en la Sección 14.9. Afortunadamente la mayoría de los hongos son inocuos para los humanos. Solamente unas 50 especies causan enfermedades en humanos y la incidencia total de infecciones fúngicas serias es baja, aunque ciertas infecciones fúngicas superficiales sean bastante comunes.

Los hongos causan enfermedades a través de tres mecanismos fundamentales. Primero, algunos hongos determinan reacciones inmunitarias que pueden resultar en reacciones alérgicas (hipersensibilidades) después de la exposición a los antígenos del hongo (*véase* Sección 22.13). La exposición a los hongos, mientras éstos crecen en el hospedador o en el ambiente, puede causar síntomas alérgicos cuando ocurre una re-exposición. Por ejemplo, *Aspergillus* ssp. (*véase* Sección 14.19) un saprofito comúnmente encontrado en la naturaleza como un moho de la hojarasca, es un potente y muy común alérgeno, que causa asma y otras reacciones de hipersensibilidad. Como veremos después, *Aspergillus* también tiene otros mecanismos para producir enfermedad.

El segundo mecanismo por el que los hongos pueden producir enfermedades es el relacionado con la producción de *micotoxinas*, un amplio y diverso grupo de exotoxinas fúngicas. El mejor ejemplo de micotoxinas son las producidas por *Aspergillus flavus*, un organismo que crece en alimentos, como el grano, almacenado de forma inapropiada. Las toxinas producidas por *A. flavus* son conocidas como *aflotoxinas* (Figura 27.16). Las aflotoxinas son muy tóxicas e

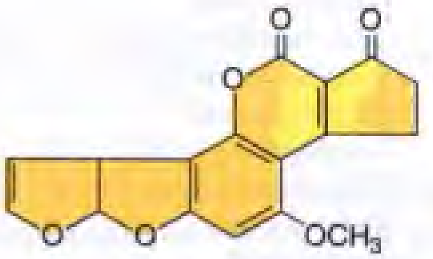


Figura 27.16 Estructura de la aflotoxina B1. Esta toxina es uno de los compuestos relacionados producidos por *Aspergillus flavus*.

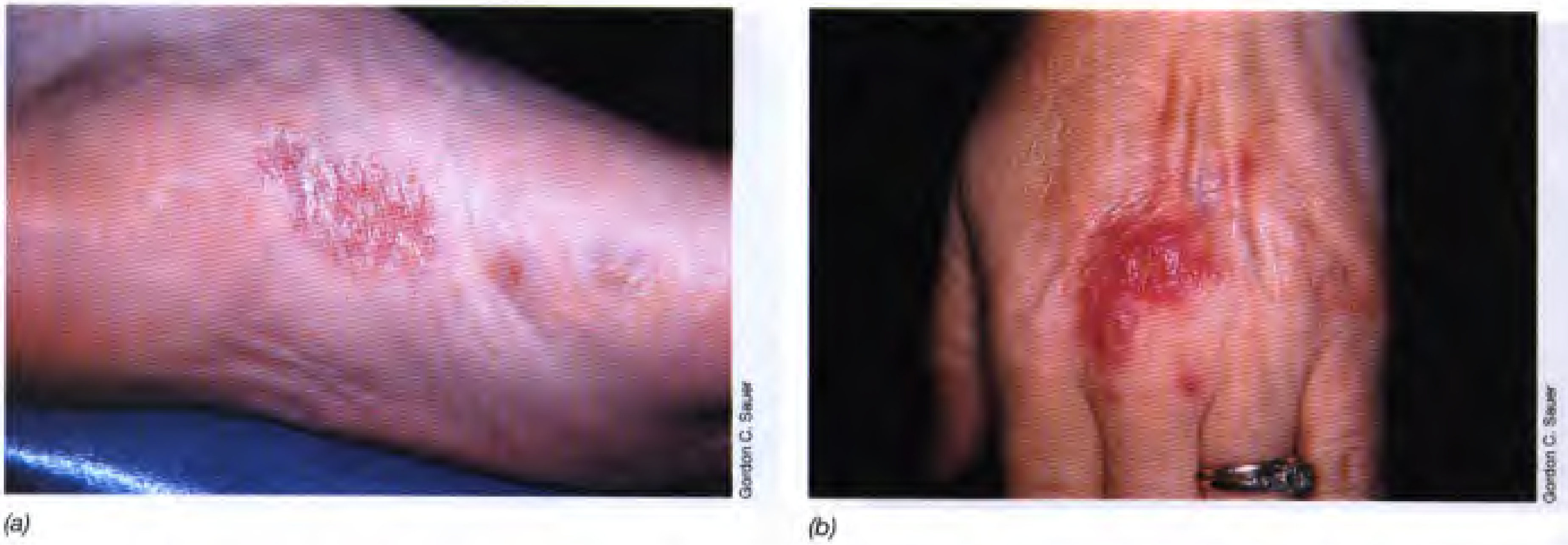


Figura 27.17 Infecciones fúngicas. (a) Micosis superficial del pie (pie de atleta) debida a la infección con *Trichophyton rubrum*. (b) Esporotrichosis, una infección subcutánea debida a *Sporothrix schenckii*.

inducen la aparición de tumores en diferentes animales, especialmente en los pájaros que se alimentan del grano contaminado. Su papel directo en enfermedades humanas no se halla bien definido.

El tercer mecanismo de los hongos para producir enfermedades se da a través de la infección. El crecimiento de los hongos sobre o en el cuerpo es llamado **micosis**. Las micosis pueden varias en severidad desde infecciones superficiales prácticamente inocuas, hasta enfermedades que comprometen la vida.

Micosis

Las micosis se dividen en tres categorías. La primera de ellas es la que aúna a las *micosis superficiales*. En estas infecciones se da la infección de la piel, el pelo o las uñas, pero únicamente en las capas superficiales de las mismas (Figura 27.17*a*). En la Tabla 27.2 se recogen algunos de los hongos superficiales más frecuentes. En general estas infecciones son relativamente benignas y auto a limitantes. Algunas como las infecciones por *Trichophyton* en los pies (pie de atleta), son muy comunes. El contagio es por contacto personal con una persona infectada o por contacto con superficies contaminadas tales como baños, duchas u otros artículos contaminados como toallas o sábanas. El tratamiento de los casos severos se realiza con la aplicación tópica de nitrato de miconazol o griseofulvina. La griseofulvina también puede aplicarse oralmente. Este fármaco, después de entrar en el torrente sanguíneo, pasa a la piel donde inhibe el crecimiento fúngico.

En las *micosis subcutáneas* afecta a las capas más profundas de la piel (Figura 27.17*b*) y son causadas por un grupo diferente de organismos (Tabla 27.2). Una enfermedad de esta categoría es la *esporotricosis*, riesgo ocupacional de los agricultores, mineros y otros trabajadores que están en contacto con el suelo. El organismo causante es un saprofito ubicuo en el suelo y la madera. Las lesiones se inician habi-

TABLA 27.2 Algunos hongos patógenos y las enfermedades que causan

Enfermedad	Agente etiológico	Principal foco de infección
Micosis superficiales (dermatomicosis)		
Gusano del anillo	*Microsporum*	Cuero cabelludo de los niños
Favus	*Trichophyton*	Cuero cabelludo
Pie de atleta	*Epidermophyton, Trichophyton*	Entre los dedos de los pies, y en piel
Prurito de Jock	*Trichophyton, Epidermophyton*	Región genital
Micosis subcutáneas		
Esporotrichosis	*Sporothrix schenckii*	Brazos y manos
Cromoblastomicosis	Diferentes géneros de hongos	Piernas y pies
Micosis sistémicas		
Criptocoquiosis[a]	*Cryptococcus neoformans*	Pulmones, meninges
Cocidioidomicosis[a]	*Coccidioides immitis*	Pulmones
Histoplasmosis[a]	*Histoplasma capsulatum*	Pulmones
Blastomicosis	*Blastomyces dermatitidis*	Pulmones, piel
Candidiasis[a]	*Candida albicans*	Cavidad oral, tracto intestinal

[a] Considerados patógenos oportunistas, han sido implicados en la patogénesis del SIDA (Sección 26.14).

tualmente por la infección fúngica de una pequeña rozadura o corte. *Sporothrix schenckii* puede ser aislado de las lesiones y cultivado *in vitro*. El tratamiento se realiza con yoduro potásico o ketoconazol, administrados ambos por vía oral.

Las *micosis sistémicas* implican el crecimiento del hongo en órganos internos del cuerpo. Pueden subclasificarse como *primarias* o *secundarias*. Una infección primaria es aquélla resultante directamente del patógeno fúngico en un individuo normal sin ninguna otra afección. La infección secundaria es la que ocurre en hospedadores con una condición que predispone a la infección, tal como la terapia con antibióticos o la inmunosupresión. En Estados Unidos la infección fúngica primaria más extendida es la *histoplasmosis*, causada por *Histoplasma capsulatum* y la *coccidioidomycosis* (fiebre del Valle de San Joaquín), causada por *Coccidioides immitis*. Ambos organismos normalmente viven en el suelo. Ambas son enfermedades respiratorias en las que el hospedador es infectado al respirar las esporas que hay en el aire, las cuales germinan y crecen en los pulmones. La histoplamosis es, primariamente, una enfermedad de las áreas rurales en el medio oeste de Estados Unidos, especialmente en los valles de los ríos Ohio y Mississippi. La mayoría de los casos son ligeros y se confunden con otras infecciones respiratorias más vulgares. La fiebre del Valle de San Joaquín está generalmente restringida a las áreas desérticas del suroeste de Estados Unidos; al menos el 80% de los habitantes pueden estar infectados, aunque la mayoría de los individuos no sufre efectos aparentes.

Algunas infecciones fúngicas, como la histoplasmosis y la cocidioidomicosis, son especialmente serias y comunes en individuos cuyo sistema inmunitario está impedido, por ejemplo, por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (*véase* Sección 26.14) o por fármacos inmunosupresores. Éstas son enfermedades fúngicas secundarias debido a que los individuos normales o bien no sufren la enfermedad, o bien manifiestan una forma menos severa de la misma. Ejemplos de otros organismos fúngicos involucrados en infecciones secundarias se muestran en la Tabla 27.2. A estos hongos se les conoce como patógenos *oportunistas* debido a su particular capacidad para causar infecciones serias sólo en individuos con los mecanismos de defensa alterados (en particular pacientes con SIDA) (*véase* Sección 26.14).

Tratamiento y control

La quimioterapia no es muy efectiva frente a las infecciones sistémicas (*véase* Sección 20.11). La mayoría de los antibióticos que inhiben los hongos también dañan a otras células eucarióticas, incluyendo las del hospedador. Uno de los antibióticos más efectivos, la anfotericina B, se usa ampliamente para tratar las infecciones fúngicas sistémicas en humanos, pero presenta serios efectos secundarios como nefrotixicidad.

El control de las infecciones mediante la eliminación de los hongos patógenos del ambiente es impracticable. Al igual que con muchos otros patógenos habituales, el control del desarrollo de los hongos es muy difícil debido a lo ilimitado de su reservorio: la exposición a los hongos no puede ser eliminada excepto a través de la descontaminación del aire mediante filtración de éste en locales con ambientes restringidos.

✓ 27.7 Revisión de conceptos

Diferentes hongos transmitidos por el suelo producen enfermedades en el hombre. Las infecciones superficiales, subcutáneas o sistémicas son difíciles de controlar debido a la carencia de fármacos antifúngicos específicos. La infecciones fúngicas pueden causar enfermedades sistémicas serias, a menudo en individuos con el sistema inmunitario alterado, tales como pacientes de SIDA.

- ✓ Describa las micosis superficiales, subcutáneas y sistémicas.
- ✓ ¿Por qué son tan difíciles de desarrollar nuevos antifúngicos?

27.8 Tétanos

El tétanos es una enfermedad importante que a menudo pone en peligro la vida. Aunque es totalmente prevenible, 473 individuos adquirieron el tétanos en Estados Unidos la última década (Figura 27.18), de los cuales murieron 68.

Biología y epidemiología

El tétanos es causado por una exotoxina producida por *Clostridium tetani*, una bacteria con forma de varilla, móvil, anóxica y formadora de esporas (*véase* Sección 12.21). El reservorio natural de *C. tetani* es el suelo, en el que es un residente ubicuo; no obstante ocasionalmente se puede encontrar en el intestino de los mamíferos, donde están otras especies de *Clostridium spp*. *C. tetani* entra, normalmente, en el cuerpo a través de heridas, cortes o pinchazos profundos. En la herida las condiciones anóxicas permiten la germinación y el crecimiento de las esporas. *C. tetani* produce una potente

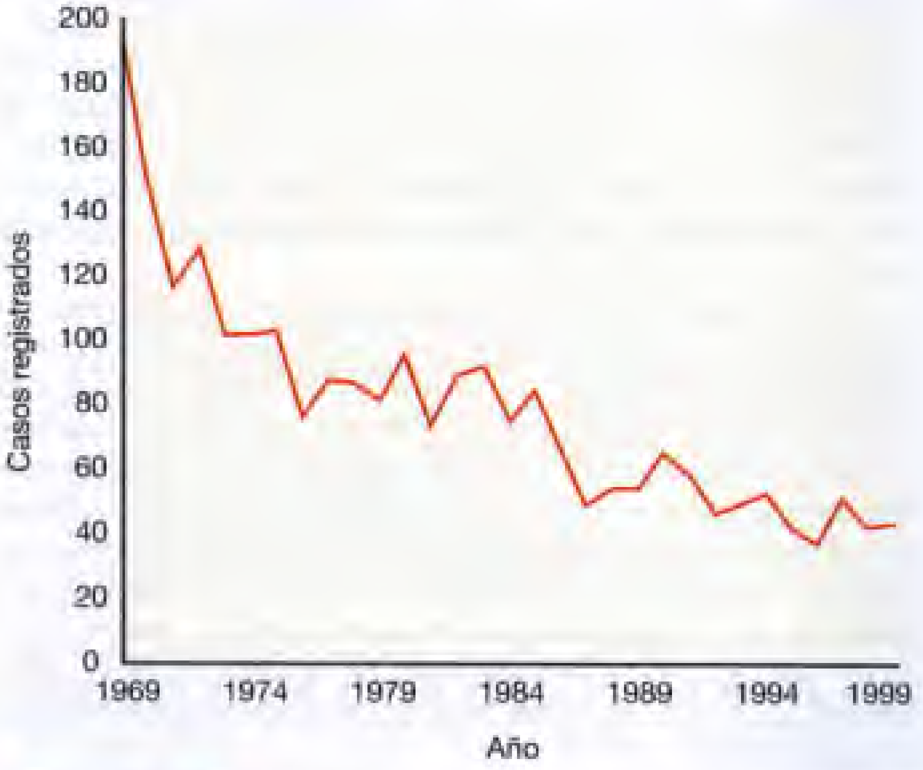


Figura 27.18 Incidencia anual del tétanos en Estados Unidos por el número total de casos anuales. El total de casos va disminuyendo, pero la mortalidad ha sido del 15% en la última década. Los datos son de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades, Atlanta, GA, EE.UU.

exotoxina, la *toxina tetánica*. El microorganismo no es invasivo y, por tanto, el único método de producir la enfermedad se realiza a través de la acción directa de la toxina en las células del hospedador. El tiempo de incubación varía desde cuatro días a varias semanas, dependiendo del número de esporas inoculadas en el momento de la herida. El tétanos no se transmite de persona a persona.

Patogénesis

Ya hemos visto la acción de la toxina tetánica a un nivel celular y molecular (*véase* Sección 21.10). La toxina afecta directamente a la liberación de moléculas inhibitorias de señalización del sistema nervioso. Este sistema inhibitorio controla la «fase de relajación» de la contracción muscular. El resultado final es la parálisis y rigidez de los músculos voluntarios, a menudo llamada *cerrojo de mandíbula*, ya que es en los músculos de la mandíbula y la cara donde primero se manifiestan estos síntomas (Figura 27.19). La muerte es frecuentemente producida por un fallo respiratorio y su porcentaje es muy alto (15% en la última década en Estados Unidos).

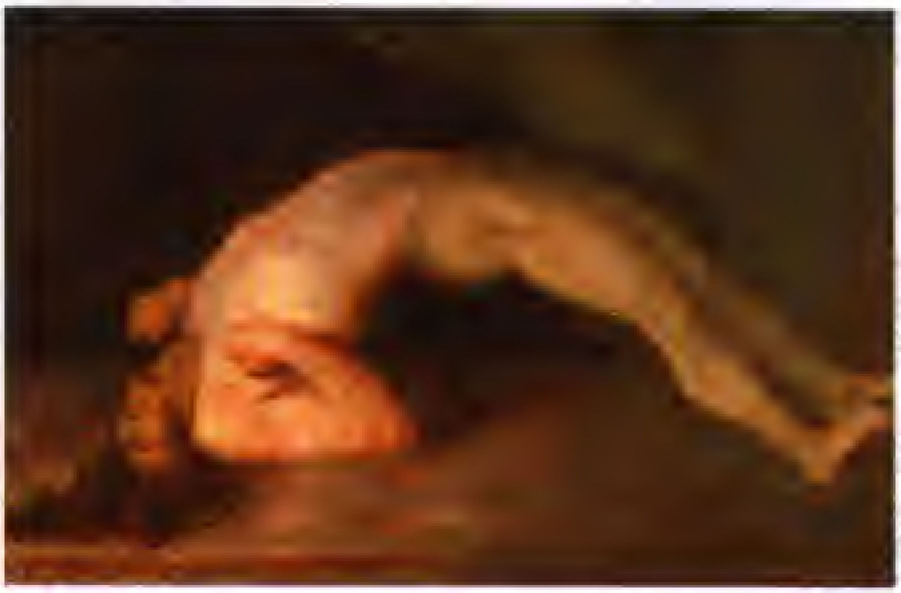

Royal College of Surgeons of Edinburgh

Figura 27.19 Un soldado muriendo de tétanos. Nótese la parálisis rígida. Pintura de Charles Bell del Royal College of Surgeons Edimburgo, Escocia.

Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico del tétanos se basa en su exposición, síntomas clínicos y, raramente, identificación de la toxina en la sangre o tejidos del paciente. El microorganismo puede ser cultivado desde la herida, pero el éxito es muy variable.

El reservorio natural de *Colstridium tetani* es el suelo. Dado que *C. tetani* es un patógeno accidental en humanos y no es dependiente de los humanos u otros animales para su propagación, su erradicación no es posible. No obstante se pueden llevar a cabo medidas de control focalizadas en la prevención.

El tétanos es una enfermedad que se puede prevenir. La vacuna existente a base del toxoide (*véase* Sección 22.11) es completamente efectiva en la prevención de la enfermedad. Prácticamente todos los casos de tétanos que no están adecuadamente inmunizados. El grupo de edad que más rápidamente incrementa el número de casos de tétanos es sorprendentemente individuos de 25 a 59 años, presumiblemente porque los programas de inmunización tienen como destinatario a los niños, individuos en edad escolar y personas de 60 años o más.

El tratamiento apropiado de los cortes importantes, laceraciones y pinchazos incluye la administración de una «dosis de recuerdo» de la inmunización con el toxoide del tétanos. Si la herida es importante y está contaminada por el suelo, el tratamiento también debe incluir la administración de una preparación con una antitoxina, especialmente si el estado de inmunización del paciente es desconocido o pasado de fecha. La antitoxina es una preparación de anticuerpo, habitualmente realizada en caballos, frente al tétanos, que neutraliza la toxina tetánica cuando es producida (*véase* Sección 22.11). Estas medidas impiden que el tétanos se manifieste.

El tratamiento del tétanos sintomático agudo incluye la administración de antibióticos, habitualmente penicilina, para detener el crecimiento y la producción de la toxina por *C. tetani*; la administración de la antitoxina para prevenir la unión de la toxina recién liberada a las células; y una terapia de soporte tal como la sedación, los relajantes musculares y la respiración mecánica para controlar los efectos de la parálisis. El tratamiento a este nivel no puede revertir los síntomas ya que la toxina que se ha unido a los tejidos no puede ser neutralizada. Incluso con antitoxina, antibióticos y terapia de soporte, los pacientes con tétanos tienen una morbilidad y mortalidad significativa.

Varios miembros del género *Clostridium* son patógenos, y prácticamente todos son habitantes normales de la comunidad microbiana del suelo. Todos los patógenos causan enfermedades porque producen exotoxinas potentes. Es imposible eliminar los clostridios, porque, como se ha dicho, viven habitualmente en el suelo. Mientras que *Clostridium tetani* se encuentra casi exclusivamente en el suelo, *C. botulinum* y *C. difficile* a veces se encuentran también en el intestino humano y de otros animales, donde son parte de la microbiota normal (Sección 21.4). *C. perfringens* y *C. botulinum*, como veremos en el Capítulo 29, son patógenos potenciales importantes, la fuente más frecuente de *Clostridium* son alimentos contaminados por suelo que contenía sus esporas. Debido a la deficiente descontaminación y a los métodos de consevación de alimentos defectuosos, las esporas pueden germinar y producir potentes exotoxinas, que causan síntomas de enfermedad.

✓ 27.8 Revisión de conceptos

Clostridium tetani es un microorganismo ubícuo transmitido por el suelo, que produce el *tétanos*, una enfermedad caracterizada por la producción de una toxina que determina una parálisis rígida. El tétanos es prevenible mediante una inmunización apropiada. El tratamiento del tétanos agudo es generalmente insatisfactorio, lo que conlleva la morbilidad y mortalidad.

✓ Describa la infección por *C. tetani* y la elaboración de la toxina tetánica.

✓ ¿Cuál es el efecto general de la toxina tetánica en el hospedador?

✓ Indique los pasos tomados para prevenir el tétanos en un individuo que ha sufrido un pinchazo con un clavo oxidado.

Preguntas de repaso

1. ¿Qué animales son susceptibles de transmitir la rabia en Estados Unidos? ¿Qué programas de inmunización se están realizando para el tratamiento de la rabia?, ¿y para la prevención de la misma?
2. ¿Por qué el síndrome pulmonar de los hantavirus (HPS) apareció como un patógeno humano en Estados Unidos? ¿Cómo se puede prevenir el HPS?
3. ¿Cuáles son las tres principales categorías de organismos que causan las enfermedades de las ricketsias? Identifique los reservorios más comunes y los vectores del tifus, la fiebre de las montañas Rocosas y la ehrlichiosis.
4. Identifique el reservorio más común y el vector de la enfermedad de Lyme en Estados Unidos. ¿Cómo se puede controlar la expansión de la enfermedad de Lyme?, ¿cómo puede tratarse?
5. La malaria presenta severos ciclos de fiebre y escalofríos durante largo tiempo. Estos síntomas están relacionados con las actividades de los patógenos *Plasmodium vivax* o *Plasmodium falciparum*. Describe a los estados de crecimiento de este patógeno en el hospedador humano y relaciónelo con los ciclos de fiebre y escalofríos. ¿Por qué una persona proveniente del oeste de Europa es más susceptible a la malaria que una persona mediterránea o africana?
6. Distingua entre peste bubónica, neumónica y septicémica. ¿Cuál es la más seria? ¿Cómo se adquiere cada una de ellas?
7. ¿Cuál es el reservorio de los hongos patógenos? ¿Cómo puede controlarse la exposición a los hongos? ¿Qué problema particular, especialmente en cuanto a la terapia, tienen los hongos para ser tratados?
8. Describa la invasividad y la toxicidad del *Clostridium tetani*. Discuta los principales mecanismos de patogénesis del tétano y defina las medidas para su prevención y tratamiento.

Ejercicios prácticos

1. Describa la secuencia de eventos que haría si un niño recibe una mordedura (provocada o no) de un perro extraviado del que no se sabe si está inmunizado frente a la rabia. Presente el caso bajo el supuesto de que haya podido capturar al perro, o de que no haya podido capturarlo. ¿Cómo pueden estas situaciones variar si el niño ha sido mordido por un perro perfectamente documentado e inmunizado frente a la rabia?
2. ¿Por qué enfermedades como el síndrome pulmonar de los hantavirus (HSP) están emergiendo como importantes enfermedades infecciosas, incluso en los países desarrollados? Incluya en sus consideraciones un comentario sobre los factores sociales, económico-ambientales y de salud pública.
3. Describa al menos tres propiedades comunes de los agentes causantes de la fiebre de las Montañas Rocosas, el tifus y la ehrlichiosis. Resuma los procesos de dichas enfermedades. ¿Por qué la ehrlichiosis está emergiendo como una importante enfermedad de las ricketsias? Compare esta emergencia con la de la enfermedad de Lyme.
4. Discuta sobre el agente etiológico, el modo de transmisión, los síntomas, la terapia, la prevención y el diagnóstico de la enfermedad de Lyme. Prediga el desarrollo de esta enfermedad en Estados Unidos en la década siguiente. Considere que el diagnóstico de la enfermedad de Lyme es muy difícil, pero que hay una vacuna efectiva disponible.
5. La erradicación de la malaria ha sido un reto de los programas de salud pública durante al menos cien años. ¿Qué factores lo hacen tan difícil? Si fuera desarrollada una vacuna efectiva, ¿podría ser erradicada la malaria? Compare esta posibilidad con la posibilidad de erradicar la peste.
6. La peste bubónica puede haber matado más del 30% de la población humana total durante diferentes pandemias ocurridas tan recientemente como en el siglo XIX. ¿Por qué no ha habido más epidemias de peste? Especule sobre la posibilidad de que los humanos hayan evolucionado hacia la resistencia a la peste. ¿Puede aportar alguna evidencia de esta hipótesis? Identifique y discuta similares cuestiones para otras enfermedades emergentes tales como el SIDA y el virus Ébola.
7. Con respecto a las infecciones, ¿por qué los hongos son a menudo patógenos oportunistas secundarios en individuos con el sistema inmune comprometido? Diseñe un ambiente que elimine cualquier exposición a los hongos. ¿Este ambiente es posible para el aislamiento de pacientes con inmunodeficiencias? ¿Conoce algún ejemplo donde esto se haya llevado a cabo?
8. Elabore un plan para asegurar que el tétanos será erradicado como enfermedad infecciosa en Estados Unidos en el año 2010. ¿Qué métodos emplearía para erradicar esta enfermedad? A nivel nacional, ¿cómo puede lograrse este objetivo? Asumiendo que la inmunización es la clave de su plan, identifique los procedimientos para asegurase de que todos los individuos reciban la inmunización.

El tratamiento eficaz de las aguas ha sido el factor más importante que ha determinado los avances realizados en salud pública en el último siglo. La potabilización de las aguas permite el consumo general del agua libre de microorganismos patógenos y de muchos compuestos químicos indeseables. La descontaminación del agua residual (mostrada aquí) se realiza de forma rutinaria a escala industrial en los países desarrollados. El agua residual debe ser tratada antes de ser vertida en las aguas superficiales, para reducir o eliminar patógenos y nutrientes que estimulan el crecimiento de algas. El objetivo fundamental del tratamiento de las aguas residuales es obtener agua con calidad suficiente para ser utilizada directamente en una planta de potabilización de agua.

28

TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES, POTABILIZACIÓN DE AGUAS Y ENFERMEDADES MICROBIANAS TRANSMITIDAS POR EL AGUA

I MICROBIOLOGÍA DE LAS AGUAS RESIDUALES Y POTABILIZACIÓN DEL AGUA 927
28.1 Salud pública y calidad del agua 927
28.2 Tratamiento de aguas residuales y contaminadas 929
28.3 Potabilización del agua para el consumo humano 932

II ENFERMEDADES MICROBIANAS TRANSMITIDAS POR EL AGUA 934
28.4 Fuentes de infecciones transmitidas por el agua 934
28.5 Cólera 935
28.6 Giardiasis y criptosporidiasis 936
28.7 Legionelosis (enfermedad del legionario) 938
28.8 Fiebre tifoidea y otras enfermedades transmitidas por el agua 939

Glosario

Agua en estado natural agua superficial o subterránea que no ha sido tratada para su consumo (también llamada «agua sin tratar»)

Agua residual líquidos contaminados con material fecal humano o animal

Agua sin tratar agua superficial o subterránea que no ha sido tratada para su consumo (también llamada «agua en estado natural»)

Agua tratada agua que se distribuye después de su tratamiento

Aguas contaminadas agua derivada del consumo humano o industrial que no puede ser vertida a un río o lago sin ser tratada adecuadamente

Clarificador (depósito de coagulación) reservorio en el cual los sólidos en suspensión del agua son coagulados y eliminados

Cloramina sustancia química producida «*in situ*» por la combinación de cloro y amoniaco en una proporción determinada

Cloro sustancia química que en su estado gaseoso se emplea para desinfectar el agua. Un cierto nivel residual se mantiene en el sistema de distribución

Coagulación formación de grandes partículas insolubles a partir de partículas coloidales mucho menores, mediante adición de sulfato de aluminio y polímeros aniónicos

Coliformes bacterias Gram negativas, no esporuladas, fermentadoras de lactosa, y aeróbicas o anaeróbicas facultativas

Demanda bioquímica de oxígeno (DBO) es la cantidad de oxígeno disuelto en el agua consumido por los microorganismos para la completa oxidación del material, tanto orgánico como inorgánico, en una muestra de agua

Filtración eliminación de las partículas en suspensión del agua mediante el paso de ésta a través de una o varias membranas o medios permeables (por ejemplo, arena, antracita o tierra de diatomeas)

Floculación proceso de tratamiento del agua, posterior a la coagulación, que mediante una ligera agitación hace que las partículas suspendidas formen masas agregadas de mayor tamaño (flóculos)

Meningoencefalitis invasión, inflamación y destrucción del tejido cerebral producido por la ameba *Naegleria fowlerii* u otros patógenos

Polímero en potabilización de aguas, sustancia química que en forma líquida se emplea como coagulante en el proceso de clarificación para producir floculación

Potable que puede ser consumido por la población

Quiste forma infecciosa de un protozoo parásito que se recubre de una delgada pared resistente de naturaleza física y química.

Sistema de distribución cañerías, depósitos de almacenamiento, tanques y otros elementos empleados para distribuir o almacenar el agua potable.

Turbidez medida de las partículas suspendidas en el agua.

El agua limpia y potable es absolutamente esencial para la salud pública, debemos por tanto disponer de métodos para conseguir agua de calidad, así como protocolos para valorar la efectividad de los métodos químicos y biológicos empleados para tratar el agua. Desafortunadamente la calidad del agua puede fácilmente verse alterada, lo que produce la transmisión de enfermedades infecciosas muy graves que incluso pueden comprometer la vida.

I MICROBIOLOGÍA DE LAS AGUAS RESIDUALES Y POTABILIZACIÓN DEL AGUA

El agua es la fuente de las enfermedades infecciosas más importante, por tanto, la potabilización del agua es la medida de salud pública más importante. Los métodos usados para valorar la calidad microbiológica del agua son métodos microbiológicos perfectamente estandarizados. Los métodos empleados para tratar el agua y conseguir que sea apta para el consumo humano incluyen una variedad de tratamientos microbiológicos para eliminar contaminantes junto con tratamientos físicos y químicos de potabilización.

28.1 Salud pública y calidad del agua

¿Cómo puede asegurarse rutinariamente la calidad apta del agua? Incluso el agua que parece limpia y clara puede estar contaminada con microorganismos patógenos, suponiendo un serio riesgo para la salud. Desafortunadamente no es práctico analizar en el agua la presencia de cada uno de los posibles patógenos que pudieran estar presentes. Sin embargo, sí es factible saber el número total de microorganismos presentes. En este apartado trataremos los métodos generales empleados para identificar los microorganismos presentes en el agua que pueden ser potencialmente patógenos.

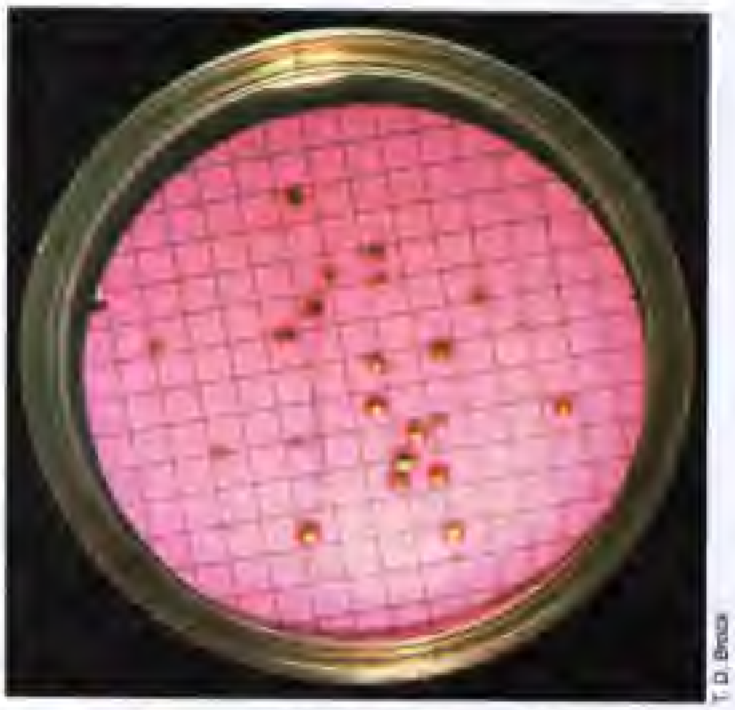
Coliformes

Mientras que la presencia de unos pocos microorganismos no patógenos en el agua puede ser tolerable, la presencia de *organismos indicadores* específicos puede indicar que esa agua puede estar contaminada con patógenos. Estos organismos indicadores están generalmente asociados con el tracto intestinal; su presencia indica contaminación fecal en la fuente de esa agua. Los microorganismos indicadores más ampliamente empleados como indicadores son los coliformes. Los **coliformes** se usan como indicadores de contaminación en el agua porque se encuentran en gran número en el tracto intestinal de humanos y animales. Los coliformes se definen en la bacteriología del agua como *bacterias* en forma de varilla, no esporuladas, Gram negativas, aeróbicas o aeróbicas facultativas que fermentan la lactosa con producción de gas cuando se incuban a 35°C durante 48h. Esta clasificación es operacional y no tiene carácter taxonómico y por ello dentro de los coliformes se incluyen una gran variedad de microorganismos, siendo la mayoría pertenecientes al grupo de las bacterias entéricas (*véase* Sección 12.11); por ejemplo, el grupo de los coliformes como el organismo *Escherichia coli*, un microorganismo intestinal muy común, *Klebsiella pneumoniae*, un patógeno intestinal menos habitual. Sin embargo, *Enterobacter aerogenes*, un organismo generalmente no asociado con el intestino, también es clasificado dentro de los coliformes debido a sus características fermentadoras.

En general, se asume que la presencia de coliformes en una muestra de agua indica contaminación fecal y hace que dicha agua no sea apta para el consumo humano. Cuando los coliformes se encuentran en el agua, finalmente mueren, pero no tan rápidamente como otros microorganismos patógenos. Los coliformes y los patógenos muestran un comportamiento similar durante el proceso de potabilización del agua.

La prueba de los coliformes

Dos procedimientos se emplean generalmente para detectar la presencia de coliformes en el agua. Estos son: el método del *número más probable* (MPN) y el método de la *filtración en membrana* (MF). El método MPN emplea medio de cultivo líquido en tubos de ensayo. Las muestras de agua se añaden a los tubos con el medio de cultivo. La aparición de crecimiento microbiano en los tubos indica contaminación en el agua que se añadió. Para el método de MF, más empleado, al menos 100 ml de la muestra de agua se pasan a través de una membrana estéril la cual retiene las bacterias (*véase* Sección 20.3). La membrana se coloca sobre la superficie de una placa de un medio de cultivo llamado azul de metileno-eosina (EMB) que es muy selectivo para el crecimiento de coliformes (*véanse* Figura 28.1 y Sección 24.2). Se cuentan las colonias y, a partir de ese valor, se puede calcular el número de bacterias coliformes presentes en esa agua. En sistemas de abastecimiento de aguas bien regulados, las pruebas para coliformes deben ser negativas. Cuando las pruebas para coliformes son positivas, indican la presencia de un fallo en el sistema de filtración/cloración o en las cañerías de distribución.



T. D. Brock

Figura 28.1 Colonias de coliformes creciendo en una membrana. Una muestra de agua potable ha sido filtrada por el filtro de membrana. El filtro se colocó sobre una placa de eosina-azul de metileno (EMB), un medio selectivo y diferencial para bacterias fermentadoras de lactosa (coliformes) (*véase* Sección 24.2). El color oscuro de las colonias es característico de los coliformes. Cada colonia representa una bacteria coliforme viable proveniente de la muestra original.

Los estándares de agua potable en los Estados Unidos están especificados por el Decreto de Agua Potable, el cual proporciona el marco para el desarrollo de los estándares de agua potable. Por el método de filtración en membrana (MF) y filtrando 100 ml de agua, el número de coliformes, para que el agua sea considerado potable no puede exceder los siguientes niveles: (1) 1/100 ml como la media aritmética de todas las muestras tomadas por mes; (2) 4/100 ml en más de una muestra cuando menos de 20 muestras son tomadas por mes; o (3) 4/100 ml en más del 5% de las muestras cuando 20 muestras o más son tomadas por mes. Los resultados son enviados a la Agencia para la Protección Ambiental de los Estados Unidos y, si no cumplen los estándares prescritos se notifica a los usuarios y se toman las medidas para corregir el problema. Muchas poblaciones pequeñas e incluso alguna gran ciudad no cumplen estos estándares en algunas ocasiones.

Salud pública y potabilización del agua

Actualmente la incidencia de enfermedades transmitidas por el agua en los países desarrollados es tan baja que hace difícil la medida de la efectividad de las prácticas de mantenimiento de los estándares de agua potable. La mayoría de las infecciones intestinales en los países desarrollados no son debidas a la transmisión por el agua si no por los alimentos (*véase* Capítulo 29). Las prácticas eficaces de tratamiento del agua no se instauraron hasta el siglo XX. Los métodos de cultivo de microorganismos para evaluar el nivel de contaminación del agua destinada al consumo no fueron adoptados hasta que los métodos de recuento de coliformes fueron desarrollados en 1905. Hasta entonces, la potabilización del agua limitaba a su filtración para reducir la turbidez (*véase* Capítulo 25, recuadro, «Snow y el cólera»). Aunque la filtración disminuye de forma significativa la presencia de microorganismos en el agua, muchos microorganismos son capaces de pasar a través de los filtros. Hacia 1910 se descubrió la enorme eficacia del **cloro** como desinfectante de grandes cantidades de agua. El cloro es tan eficaz y barato que rápidamente se generalizó su uso y es el agente más importante en la reducción de la incidencia de las enfermedades transmitidas por el agua. En la Figura 28.2 aparece la sensible caída en la incidencia de la fiebre tifoidea (infección con *Salmonella typhi*) en una gran ciudad norteamericana después de la introducción de los protocolos de filtración y cloración. Resultados similares se obtuvieron en otras grandes ciudades. El notable aumento de la salud del pueblo norteamericano en las primeras décadas del siglo XX, fue principalmente debido al establecimiento de protocolos de potabilización de agua; y la efectividad de la cloración no podría haber sido establecida si no se hubieran desarrollado métodos estandarizados para la determinación del contenido de coliformes en el agua. Así pues, los avan-

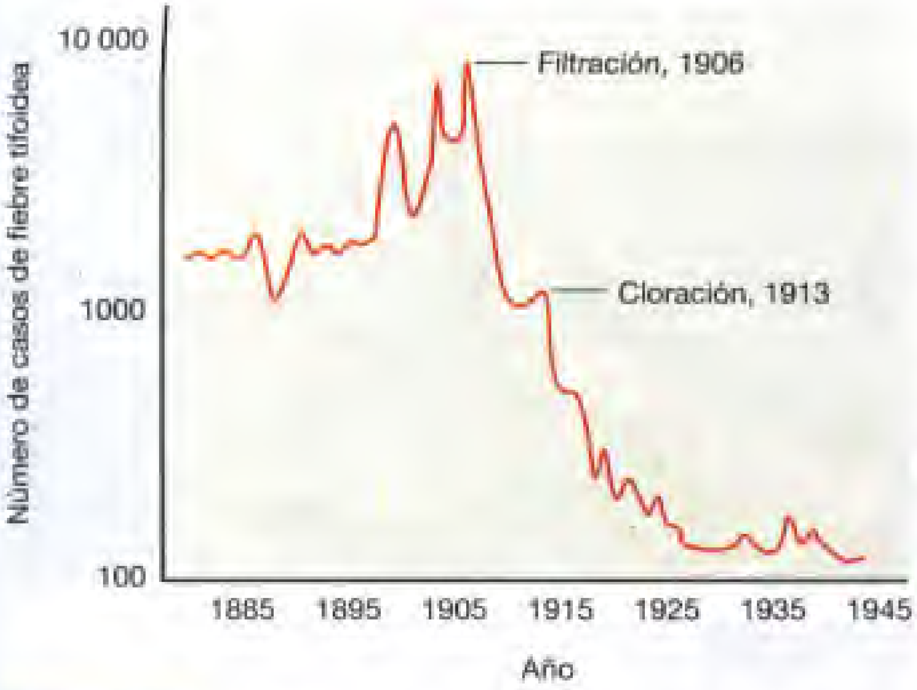


Figura 28.2 Efecto de la potabilización del agua en la incidencia de enfermedades transmitidas por la misma. El gráfico muestra la incidencia de la fiebre tifoidea en Filadelfia (Pensilvania, EE.UU) antes y después de la introducción de los procesos de filtración y la cloración del agua. Nótese la sensible reducción en la incidencia de fiebre tifoidea después de la introducción de ambos procesos. Este resultado es paralelo a los resultados obtenidos en otras enfermedades transmitidas por el agua.

ces en ingeniería pública, microbiología y salud pública contribuyeron a la consecución de este objetivo.

✓ 28.1 *Revisión de conceptos*

La calidad del agua potable es determinada mediante el recuento de los coliformes. El estricto seguimiento de los estándares microbiológicos hace que este método sea un indicador fiable y reproducible de la contaminación fecal en el agua destinada al consumo humano, en los Estados Unidos. La filtración y la cloración del agua ha disminuido significativamente la carga microbiana de ésta. La aplicación de los métodos de potabilización del agua es la medida de salud pública más importante que se ha adoptado en la historia.

- ✓ ¿Por qué las colonias bacterianas obtenidas del agua que crecen en medio EMB indican contaminación fecal de ese agua?
- ✓ ¿Qué procedimientos se emplean para reducir la carga microbiana en las fuentes de agua destinadas al consumo humano?

28.2 Tratamiento de aguas residuales y contaminadas

Las aguas residuales y su tratamiento suponen una amplia utilización de microorganismos, lo que hace que pueda ser considerado como un tipo de bioconversión a escala industrial. El agua residual entra en una planta de tratamiento y, después del mismo, el agua resultante es apta para ser vertida a ríos o incluso a sistemas de potabilización para su posterior consumo.

Aguas residuales

Las **aguas residuales** son aquéllas que proceden del uso doméstico o industrial que no pueden ser vertidas a ríos o lagos debido a los problemas de salud, económicos o estéticos que causaría. Este agua se encuentra contaminada con materiales fecales humanos o de animales. Las aguas residuales comúnmente contienen sustancias orgánicas o inorgánicas potencialmente peligrosas, así como microorganismos patógenos. Como veremos, el tratamiento completo de las aguas residuales requiere tratamientos químicos y biológicos (microbiológicos) para eliminar o neutralizar los contaminantes.

En Estados Unidos existe alrededor de 15 000 centros para el tratamiento de aguas residuales. La gran mayoría de ellos son modestos, tratando 3,8 millones de litros (1 millón de galones) de aguas residuales o menos por día. Sin embargo, en conjunto, estas plantas tratan más de 160 billones de litro por día. Habitualmente las plantas de tratamiento de aguas residuales tratan tanto las aguas de origen doméstico como las industriales. La «aguas residuales domésticas» («aguas negras») son aquéllas resultantes de la limpieza, el aseo y la cocina, y las provenientes del procesamiento de los alimentos. Las aguas residuales de origen industrial incluyen las producidas por las industrias petroquímicas, de pesticidas, preparación de alimentos e industrias lácteas, plásticos, industrias farmacéuticas e industrias metalúrgicas.

Las aguas residuales industriales pueden contener sustancias tóxicas que deben ser pretratadas antes de ser tratadas como aguas residuales. El pretratamiento generalmente consiste en un proceso mecánico por el que se eliminan los residuos que pueden dañar el equipamiento de las plantas de tratamiento. No obstante, algunas aguas son previamente tratadas biológicamente para eliminar sustancias altamente tóxicas, como cianuro y metales pesados. Estas sustancias se pueden convertir en otras menos tóxicas a través de la acción de microorganismos específicos capaces de neutralizar, oxidar, precipitar o volatilizar los residuos tóxicos o infecciosos. Vamos a comentar los procesos que tienen lugar en un tratamiento típico de aguas residuales.

Tratamiento de aguas residuales y demanda biológica de oxígeno

El objetivo del tratamiento de las aguas residuales es reducir la cantidad de materiales tanto orgánicos como inorgánicos a un nivel que no permita el crecimiento microbiano, así como la eliminación de los compuestos tóxicos que hubiera. La eficiencia del tratamiento se expresa en términos de reducción de la **demanda biológica de oxígeno (DBO)**, la cantidad relativa de oxígeno disuelto consumida por los microorganismos en la completa oxidación de toda la materia orgánica e inorgánica en una muestra de agua (*véase* Sección 19.5). Niveles altos de materiales orgánicos o inorgánicos oxidables resultan en una alta DBO. Los valores normales en las aguas residuales domésticas están en torno a 200 unidades de DBO. En el caso de aguas de origen industrial, por ejemplo provenientes de una explotación lechera, los valores pueden llegar hasta 1500 unidades de DBO. Un tratamiento eficaz reduce los niveles a menos de 5 unidades de DBO en el agua resultante del tratamiento.

Una planta típica de aguas residuales trata tanto las aguas domésticas como las industriales. El tratamiento es un proceso que se compone de múltiples etapas de carácter físico y biológico independientes (Figura 28.3). Tratamientos primarios, secundarios y, a veces, incluso terciarios, se emplean para reducir la contaminación fecal y química del agua. Cada nivel de tratamiento emplea tecnologías más complejas y caras.

Tratamiento primario de las aguas residuales

El tratamiento primario de las aguas residuales consiste solamente en separaciones físicas. El agua que entra en la planta de tratamiento se pasa a través de una serie de cribas y filtros que eliminan los objetos de gran tamaño. El líquido resultante se deja que se asiente durante unas horas para permitir la sedimentación de sólidos (Figura 28.4).

Los municipios que proporcionan sólo tratamientos primarios generan un agua extremadamente contaminado cuando el efluente es vertido en los ríos debido a la gran cantidad de materia orgánica y otros nutrientes que permanecen en las aguas después del tratamiento primario. Por ello la mayoría de las plantas dispensan un tratamiento secundario destinado a reducir la carga orgánica del agua que se devuelve a la naturaleza. Los tratamientos secundarios están íntimamente ligados a procesos microbiológicos.

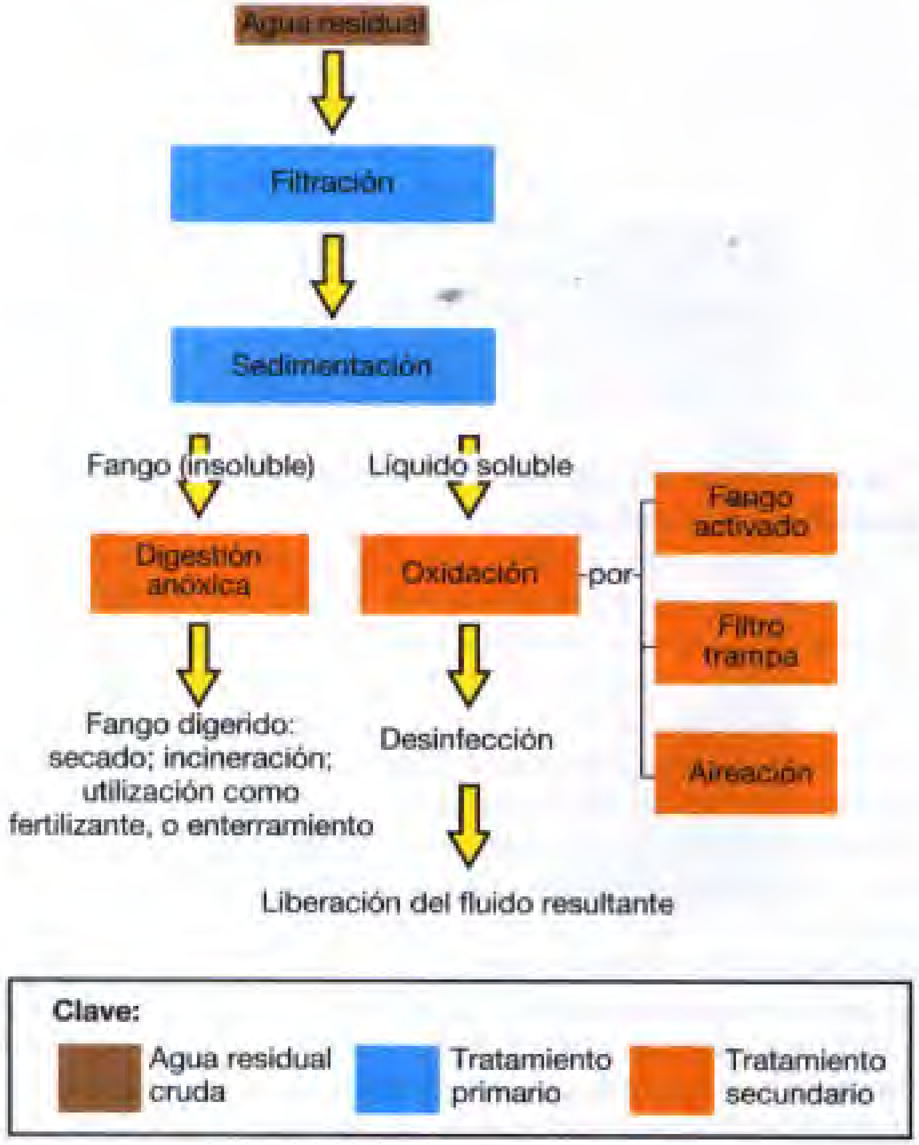


Figura 28.3 Proceso de tratamiento de aguas residuales.

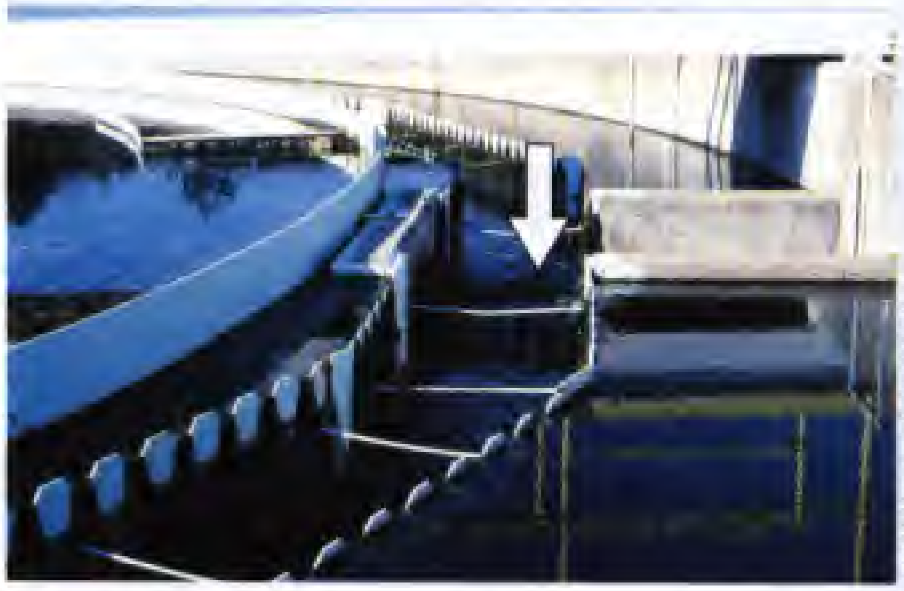

John M. Martinko y Deborah O. Jung

Figura 28.4 Tratamiento inicial de las aguas residuales. El agua residual es bombeada a un reservorio (izquierda) donde se sedimentan los sólidos. De acuerdo a la subida del nivel del agua, éste se derrama sobre cribas sucesivas de menor tamaño. El agua del nivel inferior, ahora libre de sólidos, entra en el canal de derramado (flecha) y es bombeado a la instalación para el tratamiento secundario.

Tratamiento secundario anaeróbico de las aguas residuales

El tratamiento secundario anaeróbico de las aguas residuales recoge una serie de reacciones digestivas y fermentativas llevadas a cabo por bacterias y es empleado generalmente para tratar aguas con gran contenido en materias orgánicas (y por tanto, con DBO muy alta), tales como aguas provenientes de fábricas de fibras, celulosa, alimento o leche. La degradación anóxica se lleva a cabo en grandes tanques cerrados llamados *digestores de fangos* o *biorreactores* (Figura 28.5*a* y *b*), y requiere la cooperación de muchos tipos diferentes de microorganismos; las reacciones se recogen en la Figura 28.5*c*. A través de la acción de los microorganismos anóxicos residentes, los componentes macromoleculares son primero digeridos por polisacarasas, proteasas y lipasas rindiendo componentes solubles. Estos componentes solubles son entonces fermentados produciendo una mezcla de ácidos grasos, H_2 y CO_2; los ácidos grasos son después fermentados a acetato, CO_2 y H_2. Estos productos son usados como sustrato por bacterias metanogénicas (*véanse* Secciones 12.6 y 17.17), que son capaces de llevar a cabo la reacción $CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$ y $4\,H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2\,H_2O$ (Figura 28.5*c*). Así pues, los principales productos del tratamiento anóxico son CH_4 (metano) y CO_2. El metano puede ser recogido y quemado, o usado como combustible para calentar y abastecer de energía la planta de procesamiento.

Tratamiento secundario aeróbico

En general, el agua residual no industrial puede ser eficientemente tratada empleando un proceso secundario aeróbico. Múltiples tipos de procesos de composición aeróbica se usan en el tratamiento de aguas residuales, pero los más comunes son el filtro trampa y el fango activado. Un filtro trampa (Figura 28.6*a*) es un lecho de rocas aplastadas, de alrededor de 2 m de ancho, en cuya parte superior se añade el agua residual. El líquido pasa lentamente

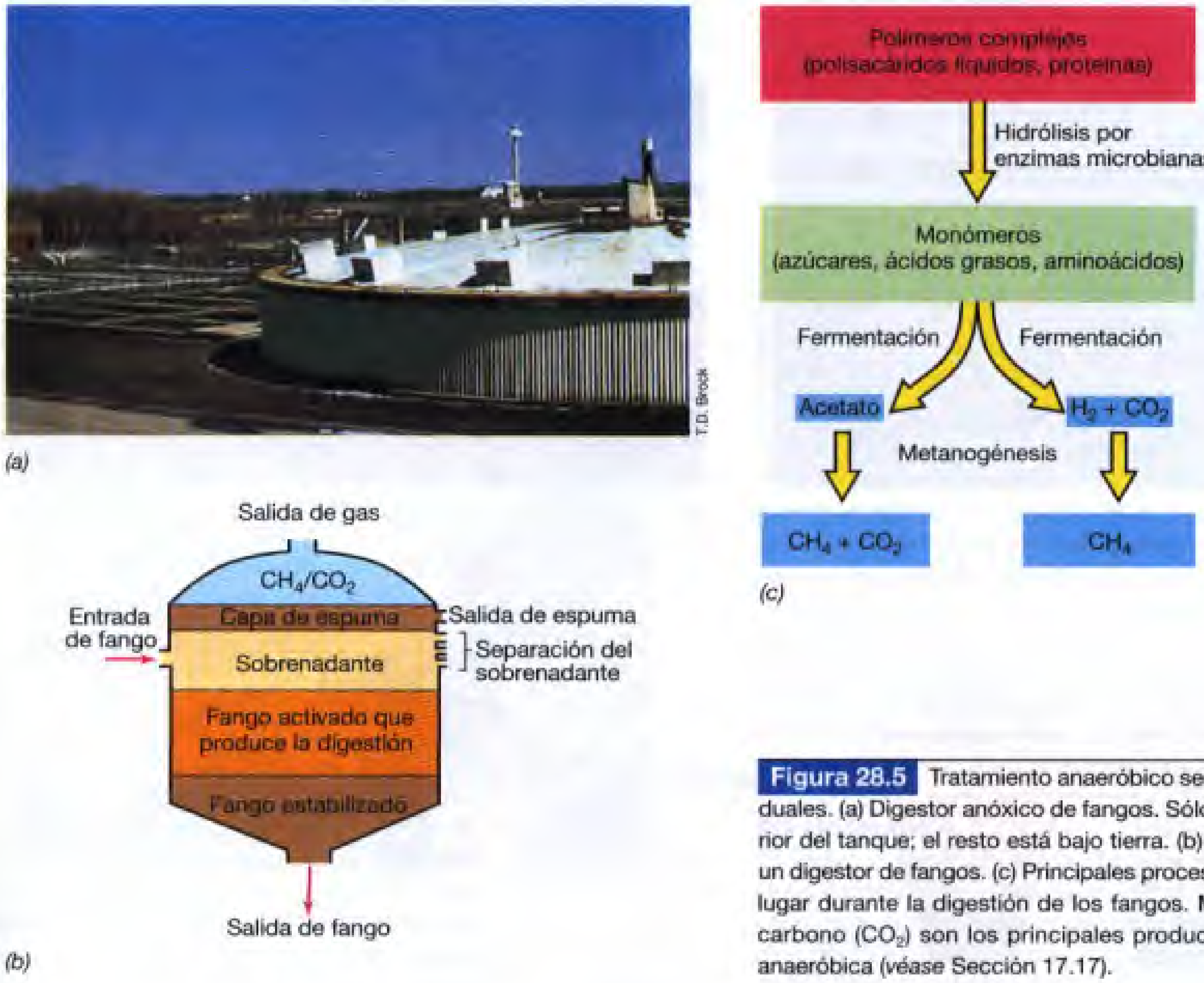

T.D. Brock
(a)
Salida de gas
CH_4/CO_2
Entrada de fango
Capa de espuma
Salida de espuma
Sobrenadante
Separación del sobrenadante
Fango activado que produce la digestión
Fango estabilizado
Salida de fango
(b)
Polímeros complejos (polisacáridos, lípidos, proteínas)
Hidrólisis por enzimas microbianas
Monómeros (azúcares, ácidos grasos, aminoácidos)
Fermentación
Fermentación
Acetato
$H_2 + CO_2$
Metanogénesis
$CH_4 + CO_2$
CH_4
(c)

Figura 28.5 Tratamiento anaeróbico secundario de las aguas residuales. (a) Digestor anóxico de fangos. Sólo se muestra la parte superior del tanque; el resto está bajo tierra. (b) Componentes internos de un digestor de fangos. (c) Principales procesos microbianos que tienen lugar durante la digestión de los fangos. Metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2) son los principales productos de la biodegradación anaeróbica (*véase* Sección 17.17).

a través del lecho y la materia orgánica se adhiere a las rocas, en cuya superficie tiene lugar el crecimiento microbiano. La completa mineralización de la sustancia orgánica hasta dióxido de carbono, amoniaco, nitrato, sulfato y fosfato tiene lugar en el biofilm microbiano que se ha formado en la superficie de las rocas. El tratamiento más común de este tipo es el fango activado. El agua que va a ser tratada es mezclada y aireada en un gran tanque (Figura 28.6*b*). Las bacterias formadoras de limo, donde se incluyen entre otras a *Zoogloea ramigera*, crecen y forman flóculos (grandes masas de agregados) (Figura 28.7), siendo estos flóculos los sustratos para el ataque de protozoos y otros pequeños animales. Ocasionalmente también se encuentran hongos y bacterias filamentosas. El proceso básico de oxidación es similar al filtro trampa. El afluente que contiene los flóculos es bombeado a un tanque de mantenimiento o *clarificador* donde los flóculos se depositan. Algunos de los flóculos (llamados *fango activado*) son devueltos al aireador donde se emplean como inóculo, y el resto es enviado al digestor anóxico de fango (*véase* más adelante) (Figura 28.5) o es retirado, secado y quemado o usado como fertilizante.

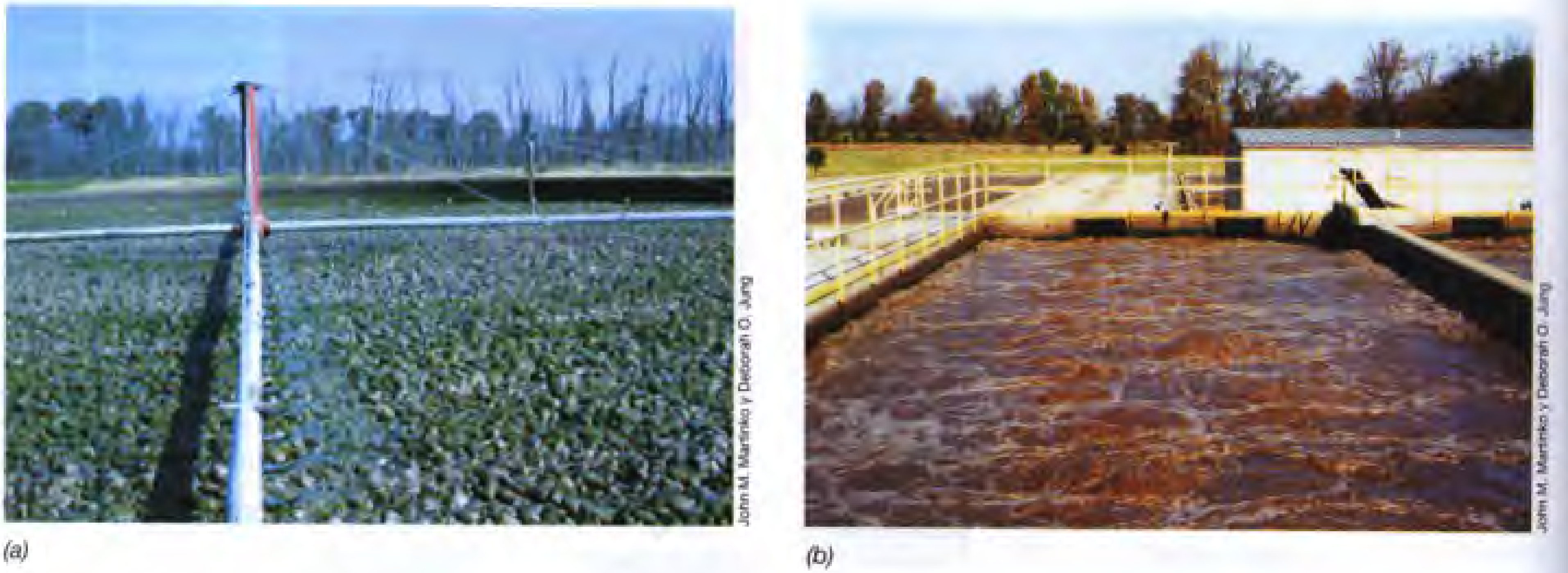
El agua residual normalmente se mantiene, entre 5 y 10 h, en el tanque de fango, tiempo insuficiente para la completa oxidación de la materia orgánica. No obstante, durante ese tiempo la mayoría de la materia orgánica soluble es adsorbida en los flóculos e incorporada en las células microbianas. LA DBO del líquido efluente es considerablemente reducida (más del 95%) gracias a este proceso, con la mayoría de la DBO depositada ahora en los flóculos y, por tanto, se consigue la deseada reducción de la DBO en el agua. Prácticamente la total reducción de la DBO tiene lugar si los flóculos son entonces llevados al digestor anóxico de fango.

La mayoría de la plantas de procesamiento cloran el efluente (para evitar la posibilidad de posteriores contaminaciones biológicas) y liberan el agua tratada a ríos o lagos. Algunas plantas, sin embargo, someten las aguas residuales a una tercera fase.

Tratamiento terciario

El tratamiento terciario es el método más completo para el tratamiento de aguas residuales aunque, debido a lo caro que resulta, su aplicación no ha sido ampliamente adoptada. El tratamiento terciario consiste en una serie de procesos fisicoquímicos en los que se incluyen precipitaciones, filtraciones y cloraciones en procesos muy similares a los seguidos para la potabilización del agua potable (*véase* Sección 28.3), para una intensa reducción de los niveles de nutrientes inorgánicos, especialmente fosfato y nitrato, del efluente final. El agua residual que recibe un apropiado tratamiento terciario es tan escaso en nutrientes que no es apta para soportar el crecimiento microbiano.

UNIVERSIDAD DE TALCA
BIBLIOTECA CENTRAL



John M. Martinko y Deborah O. Jung

John M. Martinko y Deborah O. Jung

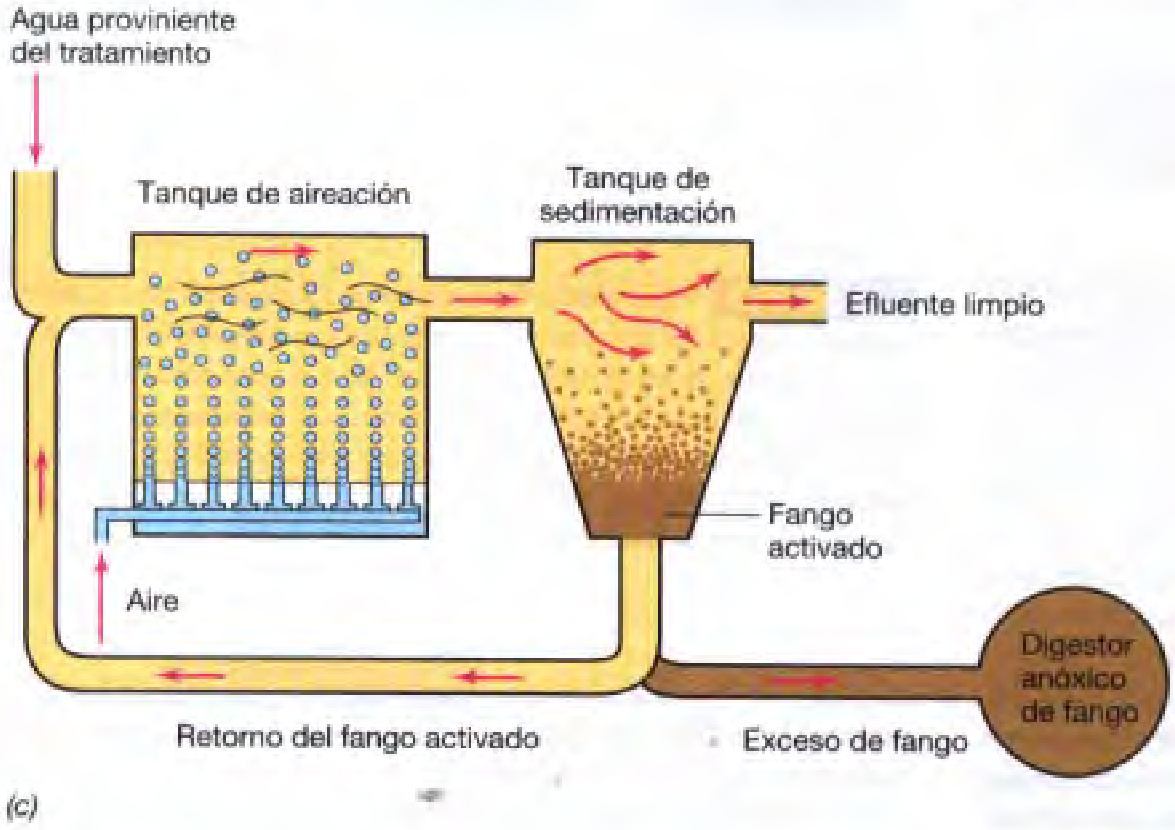


Figura 28.6 Tratamiento secundario aeróbico de las aguas residuales. (a) Filtro trampa. Se distribuye lentamente el agua residual sobre el lecho de piedras. Las piedras tienen entre 6 y 9 cm de diámetro y el lecho es de 2 m de profundidad. (b-c) El proceso de fango activado. (b) Tanque de aireación de una instalación de fango activado en una planta metropolitana de tratamiento de aguas. El tanque tiene 30 m de largo, 10 de ancho y 5 de profundidad. (c) El agua residual fluye a través de la instalación de fango activado. La recircularización del fango activado hacia el tanque de aireación es la responsable de la introducción de microorganismos encargados de la digestión aeróbica de los componentes orgánicos del agua. El digestor anóxico de fangos se detalla en la Figura 28.5.

✓ 28.2 Revisión de conceptos

El principal objetivo del tratamiento de aguas residuales es eliminar los desechos tanto domésticos como industriales del agua, reduciendo por tanto la DBO (demanda biológica de oxígeno) a niveles aceptables. En los tratamientos primarios, secundarios y terciarios del agua se emplean métodos físicos, biológicos y fisicoquímicos, respectivamente. Después del tratamiento terciario, el agua es apta para ser dirigida a una planta de potabilización de agua.

- ✓ ¿Qué es la demanda biológica de oxígeno (DBO)? ¿Por qué su reducción es importante en el tratamiento de aguas residuales?
- ✓ Identifique los procesos fundamentales de los tratamientos primarios, secundarios y terciarios de las aguas residuales.
- ✓ Defina los principales productos del tratamiento de las aguas residuales. ¿Cómo se gestionan estos productos?

28.3 Potabilización del agua para el consumo humano

Las aguas residuales, después de experimentar los métodos del tratamiento secundarios son aptas para su liberación a los ríos. No obstante, esa agua no es potable, es decir, no es apta para el consumo humano. La producción de agua potable requiere posteriores tratamientos para eliminar microorganismos potencialmente patógenos, reducir la turbidez (medida de las partículas disueltas), eliminar el sabor y el olor, y reducir la cantidad de sustancias químicas pesadas tales como hierro y manganeso.

Potabilización física y química

Una instalación típica de potabilización de agua para una ciudad pequeña se muestra en la Figura 28.8*a*. En la Figura 28.8*b* se esquematiza el flujo del agua sin tratar a través de

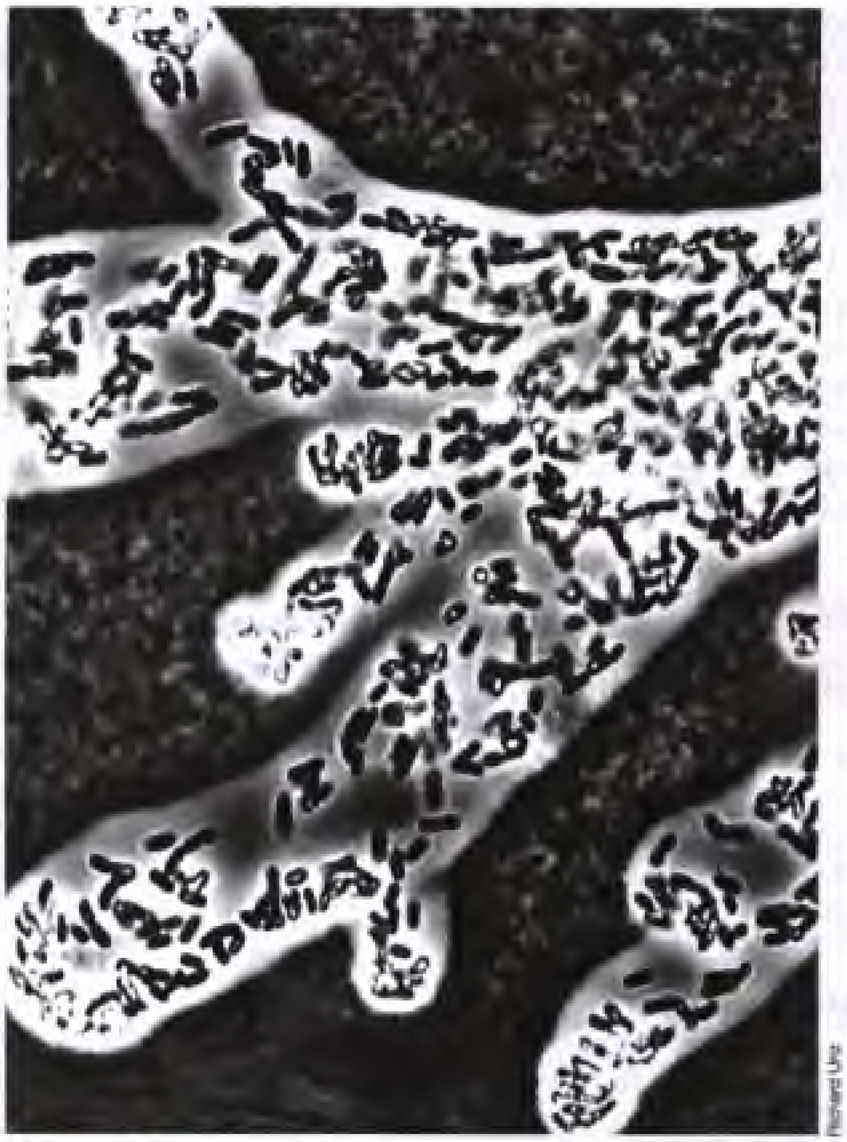
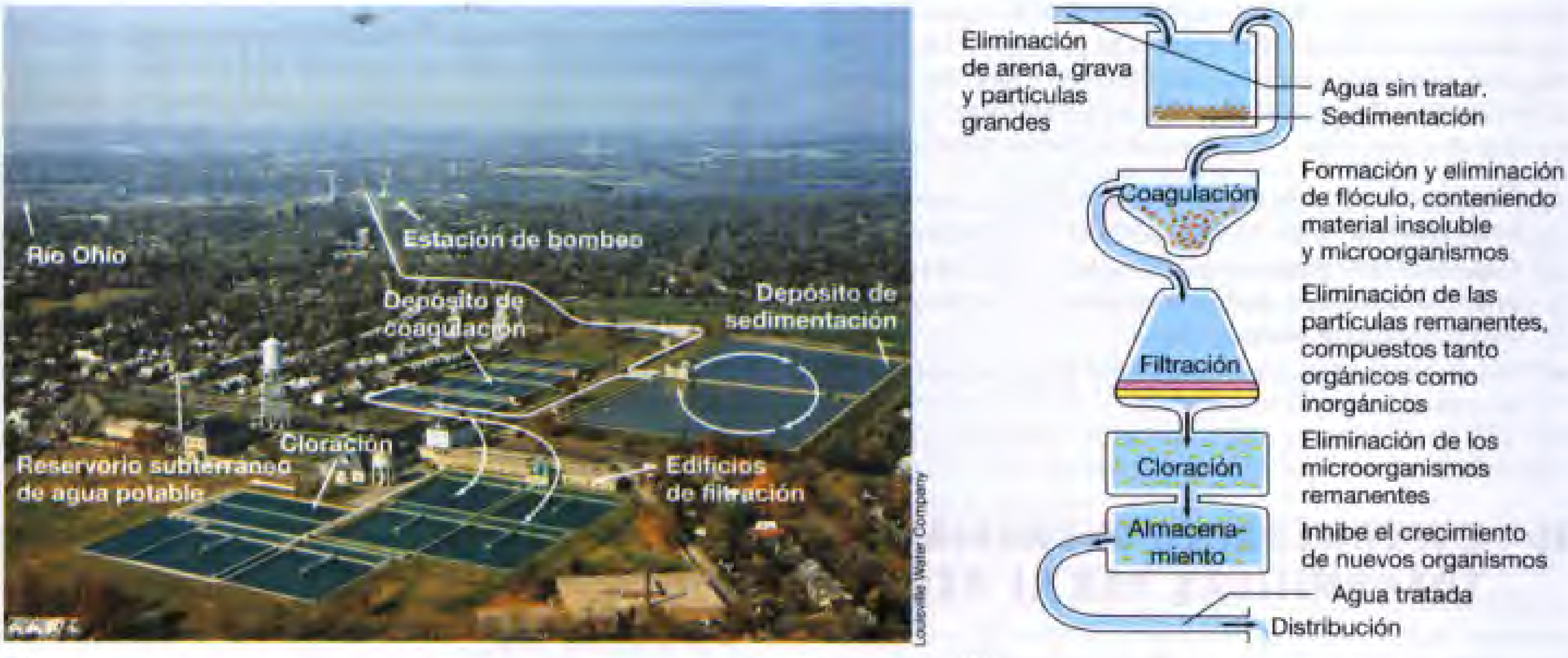

Richard Unz

Figura 28.7 Flóculo formado por la bacteria *Zoogloea ramigera*, un organismo característico del proceso de fango activado. El flóculo consiste en un gran número de bacterias en forma de varilla rodeadas por una capa de polisacáridos del limo, organizados en características proyecciones en forma de dedo. Tinción negativa empleando tinta china.

un típico proceso de potabilización. El agua es primero bombeada desde la fuente, en este caso un lago, hasta un depósito de sedimentación donde se añaden polímeros aniónicos de aluminio (sulfato de aluminio) y cloro. Arena, grava y otras partículas de gran tamaño se depositan. Esta agua previamente tratada se bombea a un depósito de **clarificación** o **coagulación**, un gran tanque donde se mantiene el agua y tiene lugar la **coagulación**: el aluminio y los polímeros aniónicos forman grandes partículas en suspensión a partir de las partículas coloidales de agua mucho menores. Después de la mezcla, la interacción entre las partículas continúa, formando grandes masas de agregados, un proceso conocido como **floculación**. Las grandes partículas agregadas, llamadas flóculos, se depositan por gravedad, atrapando y reteniendo los microorganismos y la materia orgánica en el sedimento. Después de la coagulación y la floculación, el agua sufre un proceso de **filtración**. Se pasa el agua a través de una serie de filtros diseñados para eliminar las sustancias en suspensión y los microorganismos que pudieran quedar. Los filtros suelen consistir en una serie de delgadas capas de arena y medios iónicos filtrantes. Cuando es combinado con los pasos previos de potabilización, el agua filtrada se encuentra completamente libre de cualquier materia particulada, de la mayoría de sustancias orgánicas o inorgánicas, y de todos los microorganismos.

Desinfección

El agua, después de la clarificación y la filtración, debe ser desinfectada antes de su salida al circuito de agua potable. La cloración es el método más empleado de desinfección. En dosis suficientes el cloro mata los microorganismos en 30 minutos (ciertos protozoos patógenos como *Cryptosporidium* no son fácilmente eliminados por la cloración y pueden llegar a ser importantes patógenos distribuidos por el agua (*véase*


Río Ohio
Estación de bombeo
Depósito de coagulación
Depósito de sedimentación
Cloración
Reservorio subterráneo de agua potable
Edificios de filtración
Eliminación de arena, grava y partículas grandes
Agua sin tratar. Sedimentación
Coagulación
Formación y eliminación de flóculo, conteniendo material insoluble y microorganismos
Filtración
Eliminación de las partículas remanentes, compuestos tanto orgánicos como inorgánicos
Cloración
Eliminación de los microorganismos remanentes
Almacenamiento
Inhibe el crecimiento de nuevos organismos
Agua tratada
Distribución
Louisville Water Company

(a)

(b)

Figura 28.8 Planta de potabilización de agua. (a) Vista aérea de la planta de potabilización de agua de Louisville, Kentucky, EE.UU. Las flechas indican la dirección del flujo a través de la planta. (b) Vista esquemática de un típico sistema de potabilización de agua.

Sección 28.6). Además de la eliminación de las células, el cloro interacciona con compuestos orgánicos oxidándolos y neutralizándolos de forma muy efectiva. Además, dado que los compuestos responsables del olor y el sabor del agua son orgánicos, la cloración también contribuye al mejor sabor y olor del agua. El cloro se añade al agua tanto a partir de una solución concentrada de hipoclorito sódico o cálcico como en forma de gas desde tanques presurizados. El último método es el más comúnmente empleado en las grandes plantas de potabilización ya que es más fácil su automatización.

El cloro se consume cuando reacciona con compuestos orgánicos. Por tanto, se deben añadir cantidades suficientes de cloro para que haya suficiente para eliminar los microorganismos además de la materia orgánica. El operario de la planta de potabilización realiza análisis de la cantidad de cloro residual en el agua. Una cantidad de cloro residal de 0,2-0,6 μg/ml es aceptable para la distribución. Después de la cloración, el agua potable es bombeada a tanques de almacenamiento y al sistema de distribución para su consumo. La presencia residual de cloro asegura que el agua llegue al consumidor sin haber sufrido procesos de contaminación (asumiéndose que no ha existido ningún fallo catastrófico en el **sistema de distribución**, tal como la rotura de una cañería). El cloro en forma de gas, incluso cuando se encuentra disuelto, es extremadamente volátil y se puede disipar en cuestión de horas el agua tratada. Para asegurarse que los niveles de cloro residual se mantienen a lo largo de todo el sistema de distribución, la mayoría de las plantas municipales de potabilización de agua introducen amoniaco junto con el cloro para producir un compuesto estable no volátil llamado **cloramina** ($HOCl + NH_3 \rightarrow NH_2Cl + H_2O$).

✓ 28.3 Revisión de conceptos

Las plantas de tratamiento de agua emplean sistemas físicos y químicos a escala industrial para la eliminación o neutralización de contaminantes microbianos, orgánicos e inorgánicos de una gran variedad de fuentes tanto industriales como domésticas de aguas residuales. Las plantas de potabilización de agua emplean procesos de clarificación, filtración y desinfección para la producción de agua potable. El agua potable final se encuentra libre de contaminación tanto química como biológica.

✓ Esquematice el tratamiento del agua residual desde su entrada hasta su salida en una planta de tratamiento.

✓ Esquematice el tratamiento del agua a través de una planta de potabilización de agua desde la entrada hasta el punto final de distribución (grifos).

✓ Señale las funciones específicas del cloro en la potabilización de agua.

II ENFERMEDADES MICROBIANAS TRANSMITIDAS POR EL AGUA

La contaminación microbiana de los materiales utilizados por muchos individuos es una *fuente muy común de enfermedades infecciosas*. Estas fuentes comunes pueden ser el agua o los alimentos contaminados. Trataremos las enfermedades transmitidas por los alimentos en el Capítulo 29. Las enfermedades transmitidas por el agua son una importante fuente de morbilidad y mortalidad, especialmente en los países en vías de desarrollo. Una gran variedad de bacterias, virus y protozoos causan las enfermedades infecciosas transmitidas por el agua.

Las enfermedades transmitidas por el agua comienzan como infecciones. El agua puede producir infecciones incluso si sólo presenta una pequeña cantidad de microorganismos; el número exacto de patógenos necesarios para producir una infección está en función de la virulencia del patógeno y la habilidad del hospedador para resistir la infección (*véanse* Secciones 21.8 y 21.13).

28.4 Fuentes de infecciones transmitidas por el agua

Los microorganismos patógenos del hombre pueden ser transmitidos a través del agua de consumo (para beber o cocinar) no tratada apropiadamente. Otra fuente muy común de transmisión de enfermedades se produce a través del agua contaminada con patógenos, usada para bañarse o nadar.

Agua potable

Ya que todos consumimos agua, el agua potable es una fuente común de transmisión de patógenos y es muy importante en la transmisión de enfermedades y epidemias con consecuencias catastróficas. Como discutiremos más adelante, el agua en los países desarrollados ha de pasar por estrictos estándares de higiene, limitando muy efectivamente la transmisión de enfermedades. No obstante, existen importantes brotes de enfermedades transmitidas por el agua en los países en vías de desarrollo; e incluso en países desarrollados se sufren importantes brotes de enfermedades transmitidas por el agua debido a fallos en la potabilización de la misma.

Los microorganismos transmitidos por el agua generalmente se multiplican en el intestino y se eliminan del cuerpo a través de las heces. Esto puede determinar la aparición de una contaminación fecal de las fuentes de suministro de agua, si la contaminación no es identificada (por ejemplo, mediante la prueba de los coliformes; *véase* Sección 28.1) y eliminada por la desinfección (*véase* Sección 28.3); entonces un nuevo hospedador puede consumir esa agua y el patógeno puede colonizar el intestino dando lugar a una enfermedad. En los Estados Unidos, un número significante de diferentes bacterias y protozoos patógenos se transmiten ocasionalmente a través del agua potable (Tabla 28.1). Vamos a discutir la giardiasis y criptosporidiosis en la Sección 28.7, y dejaremos las shigellosis y las infecciones por *Escherichia coli* O157:H7 para el Capítulo 29, donde introduciremos estos patógenos como agentes causantes de infecciones transmitidas a través de los alimentos.

Agua para recreo

El agua para actividades de recreo incluye áreas de recreo tales como ríos, lagos, piscinas públicas y estanques. La manipulación, desinfección y filtración se encuentran reguladas por los departamentos locales y estatales de salud. En los

TABLA 28.1 Brotes de enfermedades infecciosas transmitidas por el agua asociadas al agua potable en Estados Unidos[a]

Enfermedad	Agente etiológico	Brotes	Casos
Shigellosis	*Shigella sonnei*	1	183
Giardiasis	*Giardia lamblia*	4	159
Criptoporidiasis	*Cryptosporidium parvum*	2	1432
Gastroenteritis	*Escherichia coli* O157:H7	3	164
Enfermedades gastrointestinales agudas	Desconocido	5	163

[a] Datos recogidos por los Centros de Control de Enfermedades en 1997-1998. Hubo un total de 15 brotes y 20 001 casos de enfermedades infecciosas debidas a contaminación del agua de consumo.

Estados Unidos, la Agencia de Protección Ambiental ha establecido las directrices para el agua para recreo (mensualmente, una media aritmética de ≤ 33/100 ml para enterococos o ≤ 126/100 ml para *E. coli*), si bien las autoridades estatales o locales pueden establecer estándares por encima o por debajo de estas directrices. Piscinas privadas y por tanto fuera de la regulación y balnearios son ocasionalmente fuentes de brotes de enfermedades transmitidas por el agua.

En la última década, alrededor de 15 brotes de enfermedades transmitidas por el agua han aparecido anualmente como consecuencia del agua para recreo regulada en los Estados Unidos. En la Tabla 28.2 se organizan estos brotes de acuerdo con las enfermedades producidas.

Infecciones transmitidas por el agua en países en desarrollo

Las infecciones transmitidas por el agua son un problema muy importante en los países en desarrollo, mucho más que en los Estados Unidos u otros países desarrollados. Los países en desarrollo, normalmente no disponen de sistemas apropiados de potabilización de agua potable y tratamiento de aguas residuales. Como resultado, enfermedades como el cólera (Sección 28.5), fiebres tifoideas y amebiasis (Sección 28.8) son importantes problemas de salud pública.

TABLA 28.2 Brotes de enfermedades infecciosas transmitidas por el agua de recreo, 1989-1998

Enfermedad	Número de brotes	Porcentaje
Gastroenteritis[a]	74	49,0
Dermatitis	50	33,1
Meningoencefalitis	18	11,9
Otras	9	6,0
Total	**151**	**100,0**

[a] La mayoría de los casos de gastroenteritis fueron causados por *Cryptosporidium parvum* (Sección 28.6), o un virus tipo Norwalk (Sección 28.8). La mayoría de los casos de dermatitis fueron causados por *Pseudomonas aeruginosa*. La meningoencefalitis fue causada por la ameba *Naegleria fowleri* (Sección 28.8). Las otras enfermedades causadas por microorganismos donde se incluyen la leptospirosis y la fiebre de Pontiac fueron debidas a infecciones por *Legionella* (Sección 28.7).

✓ 28.4 Revisión de conceptos

El agua de consumo y de recreo pueden ser fuente de patógenos. En los Estados Unidos, el número de brotes de enfermedades debido a estas fuentes es pequeño en relación al enorme número de exposiciones al agua. Alrededor del mundo, la carencia en el tratamiento del agua contribuye significativamente a la expansión de enfermedades infecciosas.

- ✓ Identifique los microorganismos más comúnmente responsables de los brotes de enfermedades debidos al consumo de agua contaminada.
- ✓ Identifique la enfermedad más común causada por la exposición a agua de recreo contaminada.

28.5 Cólera

El cólera es una severa enfermedad diarreica que actualmente se encuentra restringida a las áreas del mundo en desarrollo. El cólera es uno de los mejores ejemplos de enfermedades transmitidas por el agua, que se podrían controlar fácilmente mediante la aplicación de medidas destinadas al tratamiento del agua.

Biología y epidemiología

La enfermedad del cólera es causada por *Vibrio cholerae*, una bacteria Gram negativa con forma de varilla curvada (*véase* Sección 12.12), que se transmite casi exclusivamente a través del agua contaminada. Sin embargo, al igual que ocurre con otras muchas enfermedades transmitidas por el agua, el cólera también se asocia con el consumo de alimentos. En América el cólera se ha relacionado con el consumo de moluscos bivalvos y vegetales crudos. Presumiblemente los vegetales fueron lavados con aguas contaminadas y los lechos de crecimiento de los moluscos estaban contaminados con aguas residuales.

Desde 1817 el cólera ha arrasado el mundo en siete grandes pandemias. La última comenzó en 1961 y continúa hasta la actualidad. Se han reconocido dos biotipos de *Vibrio cholerae*, el clásico y *El Tor*. La cepa clásica de *V. cholerae* fue aislada por primera vez por Robert Koch en 1883 y fue el biotipo responsable de las pandemias anteriores a 1961. El biotiopo El Tor es el responsable de la séptima pandemia que comenzó en 1961. Al menos 5 millones de casos de cólera se han registrado desde 1961, produciendo 250 000 muertes. En 1999, hubo más de 400 000 casos y 9000 muertes en todo el mundo.

El cólera es endémico de África, sudeste asiático, subcontinente Indio y America Central y del Sur, especialmente en la áreas donde el tratamiento de las aguas residuales es deficiente o inexistente. Los viajeros que se dirijan hacia las áreas endémicas deben considerar la posibilidad de la inmunización frente al cólera. Incluso en países desarrollados el cólera es una enfermedad peligrosa. Brotes esporádicos (menos de 250 casos en total) han sido recogidos en los Estados Unidos, principalmente a lo largo de la costa del Golfo, en los últimos 10 años. Los moluscos bivalvos crudos pueden ser el vehículo de transmisión; *Vibrio cholerae* parece ser endémico y capaz de vivir autónomamente en las aguas costeras, adhiriéndose a la biota normal (Figura 28.9).

El control del cólera depende primeramente de medidas sanitarias adecuadas; *Vibrio cholerae* es completamente eliminado de las aguas residuales durante el tratamiento apropiado de las mismas y durante la potabilización del agua.

Patogénesis

Después de la ingestión de un inóculo importante, las células de *V. cholerae* se asientan en el intestino delgado. Estudios en humanos voluntarios han mostrado que la acidez del estómago es la responsable de que sea necesario un inóculo grande para que se inicie el cólera. Se requiere normalmente la ingestión de 10^8 a 10^9 vibrios del cólera para que se produzca la enfermedad, sin embargo en los voluntarios a los que se administró bicarbonato para neutralizar la acidez del estómago, tan sólo se necesitaron 10^4 células. Incluso un menor número es capaz de iniciar la infección si *V. cholerae* es ingerido con los alimentos, presumiblemente porque la comida protege a las bacterias de la acidez del estómago.

Cuando los vibrios se unen a las células epiteliales en el intestino delgado, crecen y liberan una enterotoxina (*véase* Sección 21.11). La toxina colérica causa diarrea que puede determinar la deshidratación y la muerte si el paciente no recibe terapia a base de líquidos y electrolitos. La enterotoxina causa una perdida de fluido mayor de 20 l (20 kg) por día. La tasa de mortalidad en enfermos de cólera no tratados alcanza el 60%.

Diagnóstico y tratamiento

El cólera se diagnostica por la presencia de los bacilos Gram negativos en forma de coma de *Vibrio cholerae* en las heces diarreicas de los pacientes. La terapia a base de ingestión de líquido oral e intravenoso (20 g de glucosa, 4,2 g de NaCl, 4,0 g de $NaHCO_3$ y 1,8 g de KCl disuelto en 1,0 l de H_2O) es la más eficaz. El tratamiento oral es el preferido, ya que no necesita de equipamiento especial o estéril.

El tratamiento reduce la tasa de mortalidad hasta el 1%. La estreptomicina o la tetraciclina pueden reducir el curso de la enfermedad, pero son de escaso beneficio sin el simultaneo aporte de fluido y electrolitos.

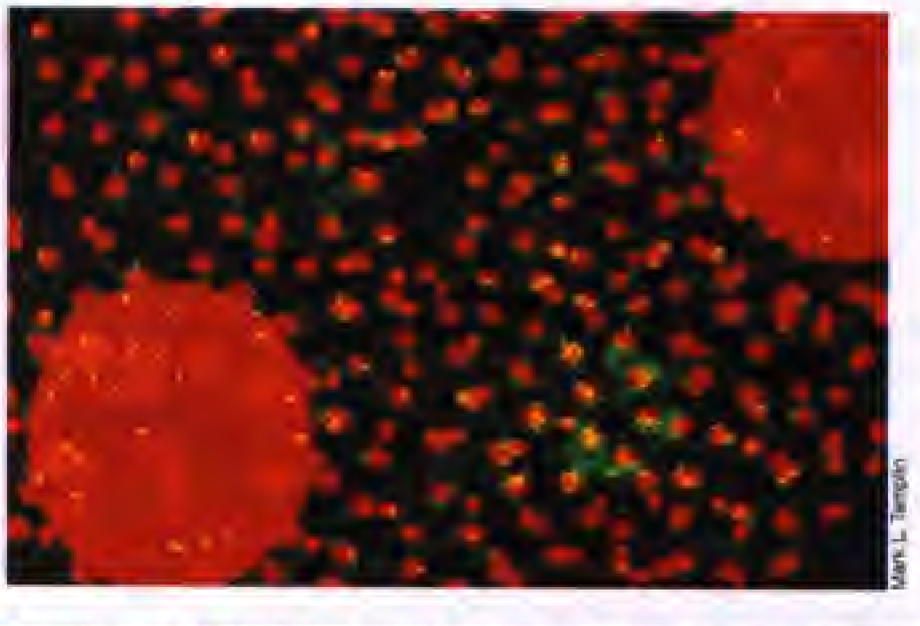

Mark L. Tamplin

Figure 28.9 Células de *Vibrio cholerae* unidas a la superficie de *Volvox*, un alga de agua dulce. El aislado se obtuvo de un área de Bangladesh donde el cólera es endémico. Las células de *Vibrio cholerae* están teñidas de verde por un anticuerpo monoclonal frente a las proteínas de superficie de la bacteria. El color rojo es debido a la fluorescencia de la clorofila *a* del alga.

✓ 28.5 Revisión de conceptos

Vibrio cholerae es un patógeno que causa el cólera, una enfermedad que produce diarrea aguda y determina una severa deshidratación. El cólera se presenta en pandemias. La pandemia actual tiene focos endémicos en América, India, Asia y África.

- ✓ Señale las medidas para prevenir el cólera en áreas endémicas.
- ✓ Indique medidas específicas para el tratamiento del cólera.

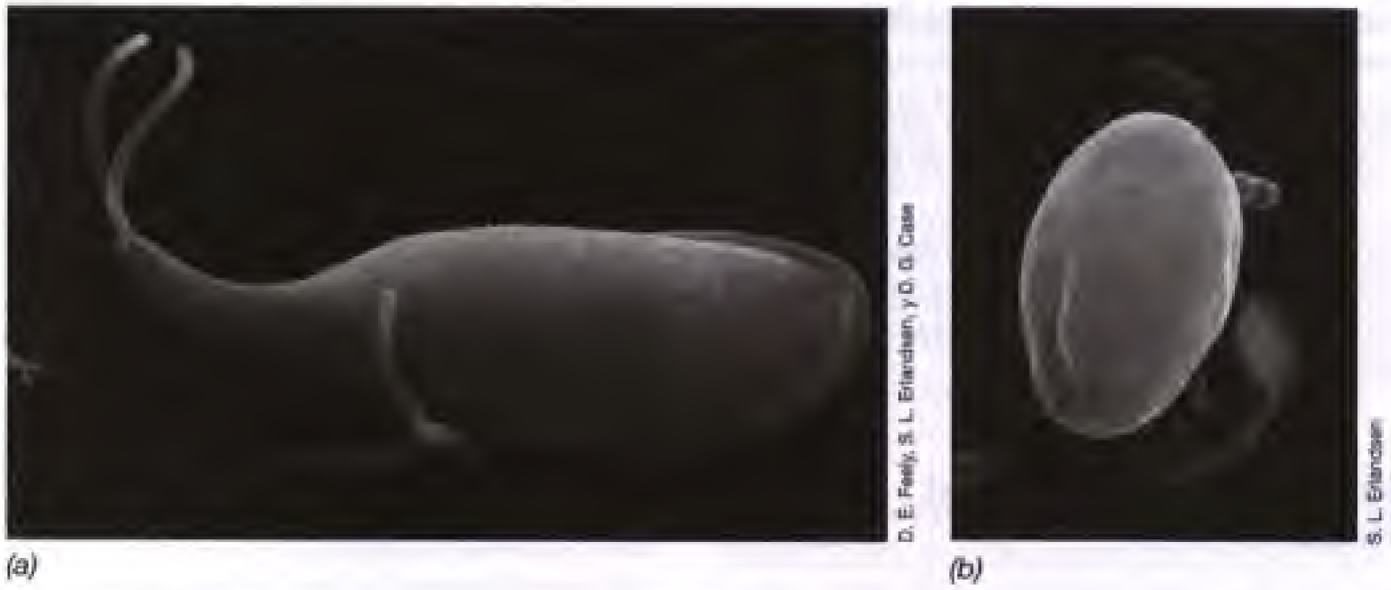
28.6 Giardiasis y criptosporidiasis

La giardiasis y la criptosporidiasis son enfermedades causadas por los protozoos *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum*, respectivamente. Estos organismos representan un problema, incluso en las aguas correctamente tratadas, porque se encuentran prácticamente en todas las aguas superficiales y son muy resistentes al cloro.

Giardiasis

Giardia lamblia es un protozoo flagelado (*véase* Sección 14.8) que se puede transmitir a los humanos a través de agua contaminada con restos fecales, si bien también han sido documentados casos de transmisión por alimentos y por contacto sexual. La giardiasis es una gastroenteritis aguda causada por el nombrado protozoo parásito (Figura 28.10). Las células del protozoo, llamadas trofozoides (Figura 28.10*a*) producen un estado de reposo llamado **quiste** (Figura 28.10*b*). El quiste dispone de una delgada pared de protección que permite al parásito resistir las condiciones de deshidratación y los tratamientos químicos. Después de la ingestión en agua contaminada, los quistes germinan, se unen a las paredes de los intestinos y causan los síntomas de las giardiasis: diarrea repentina, líquida y maloliente, calambres intestinales, flatulencia, náuseas, pérdida de peso y malestar. Los síntomas pueden ser agudos o crónicos. La diarrea maloliente y la ausencia de sangre o mucus en las heces ayudan a diferenciar el diagnóstico de la giardiasis de otras gastroenteritis de carácter vírico o bacteriano. Muchos individuos están infectados pero no muestran síntomas, siendo portadores.

Giardia está implicada en 4 de los 15 brotes recientes de enfermedades infecciosas transmitidas por el agua en los Estados Unidos (Tabla 28.1). La giardiasis puede también aparecer por la ingesta accidental del agua contaminada de una piscina o lago. Los quistes de *Giardia* se han encontrado en el 97% de las fuentes de aguas superficiales (ríos, lagos, estanques) de los Estados Unidos. Los quistes son resistentes a la cloración gracias a su pared, y muchos de los brotes se han asociado con sistemas de potabilización de



D. E. Feely, S. L. Erlandsen, y D. G. Case

S. L. Erlandsen

(a)

(b)

Figura 28.10 Micrografías electrónicas de barrido del parásito *Giardia*. (a) Trofozoide móvil. El trofozoide mide 15 μm de longitud. (b) Quiste. El quiste mide 11 μm de longitud.

agua que únicamente emplean cloro. Las aguas sometidas a apropiados procesos de clarificación y filtración seguidos de cloración (*véase* Sección 28.3) están generalmente libres de quistes de *Giardia*.

Casos aislados de giardiasis se han asociado con la ingesta de agua no tratada en zonas silvestres. Castores y ratas azmilcleras son portadores habituales de este protozoo, y pueden transmitir células o quistes al agua, produciendo infecciones en humanos cuando ésta es ingerida. Como medida de precaución todo el agua consumida de ríos, por ejemplo durante una acampada o ruta caminando, debe ser filtrada y tratada con yodo o cloro, o filtrada y hervida. El hervido es el método que mejor asegura un agua microbiológicamente aceptable.

Los métodos de diagnóstico en el laboratorio incluyen la detección de los quistes de *Giardia* en las heces o la demostración de la presencia de sus antígenos mediante ELISA (*véase* Sección 24.11). Los medicamentos quinacrina, furazolidona y metronidazol son de utilidad en el tratamiento de la infección aguda.

Criptosporidiasis

El protozoo *Cryptosporidium parvum* aparece en la naturaleza como parásito de una gran variedad de animales de sangre caliente. Los parásitos son minúsculos (2-5 μm), redondeados, e invaden y crecen intracelularmente en las células del epitelio mucoso de intestino y estómago. El protozoo produce oocistos infecciosos, con una pared gruesa y resistentes al cloro, que son liberados al agua en gran número a través de las heces. La infección se transmite cuando otro animal consume el agua contaminada por las heces. Los quistes de *Cryptosporidium* son muy resistentes a la cloración (más de 14 veces más resistentes que la por sí resistente *Giardia*), y por tanto métodos de filtración y sedimentación son precisos para eliminarlos de las fuentes de agua potable.

Cryptosporidium parvum fue el responsable del mayor brote de una enfermedad transmitida por agua que aún se recuerda. En Milwaukee, Wisconsin, en la primavera de 1993, alrededor de 400 000 personas desarrollaron una enfermedad diarreica que fue diseminada por la red municipal de abastecimiento de agua. Las lluvias primaverales arrastraron hasta el lago Michigan los materiales de las granjas de la zona y sobrecargaron el sistema de abastecimiento de agua, produciendo la contaminación por el protozoo. *C. parvum* es además un parásito intestinal de la cabaña lechera, la fuente más probable de este brote.

La criptosposiosis se caracteriza por una diarrea suave. En individuos normales la diarrea es autolimitante y la mayoría se recuperan sin mayor problema en el plazo de dos semanas. Sin embargo en individuos con problemas en el sistema inmunitario, tales como pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), o individuos muy jóvenes o muy mayores pueden desarrollar serias complicaciones. En el brote de Milwaukee, alrededor de 4400 personas requirieron cuidados hospitalarios y algunas murieron debido a las complicaciones asociadas a la enfermedad, entre las que se incluye una severa deshidratación.

El brote de Milwaukee ejemplifica la debilidad de los sistemas de potabilización de agua, y la necesidad de un continuo control y vigilancia, así como las catastróficas consecuencias que puede tener un fallo en es sistema de abastecimiento de agua.

Los métodos de laboratorio para el diagnóstico de la criptosporidiosis incluyen la demostración de la presencia de oocistos en las heces. El tratamiento no es necesario en personas con un sistema inmunitario intacto, pero en individuos sometidos a terapia inmunosupresora (por ejemplo, prednisona), se aconseja la interrupción del tratamiento de inmunosupresión. Individuos inmunocomprometidos deben someterse a terapia (por ejemplo, a la administración intravenosa de fluidos y electrolitos).

✓ 28.6 Revisión de conceptos

La giardiasis y la criptosporiosis son producidas por los quistes resistentes al cloro formados por *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum*, respectivamente, en agua contaminada con heces de humanos o animales infectados. Estas enfermedades son ocasionalmente propagadas por el agua potable y el de recreo. La infección por ambas causa diarrea.

- ✓ Explique la importancia de los quistes en la supervivencia e infectividad tanto de *Giardia lamblia* como de *Cryptosporidium parvum*.
- ✓ ¿Por qué se asocian con frecuencia los protozoos con las enfermedades transmitidas por el agua, incluso en países desarrollados? Mencione los pasos necesarios para la reducción de su incidencia.

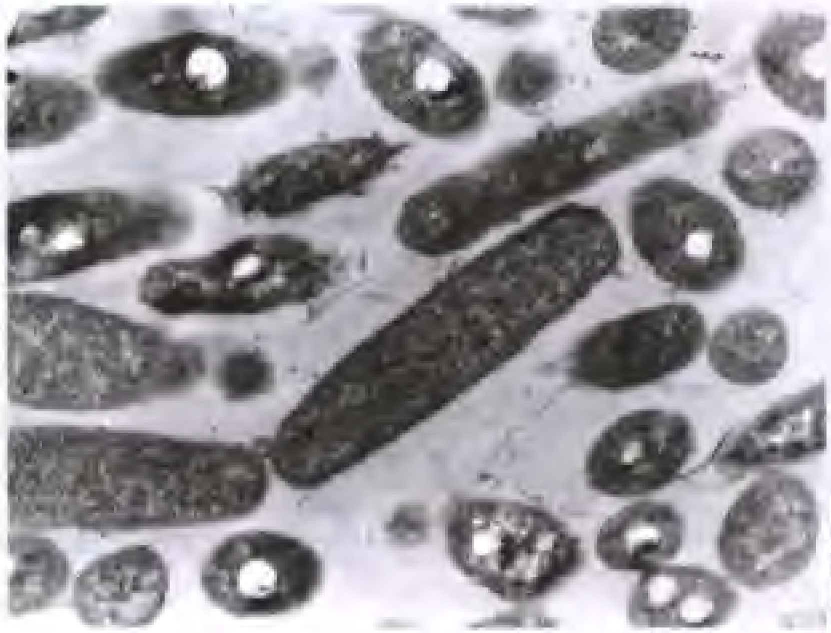
28.7 Legionelosis (enfermedad del legionario)

Legionella pneumophila, la bacteria que causa la legionelosis, es un patógeno que se transmite por el agua, normalmente en aerosoles más que por el agua de bebida o de recreo, llegando a ser una importante y emergente enfermedad transmitida por el agua, especialmente en países desarrollados (*véase* Sección 25.10).

Biología y epidemiología

Legionella pneumophila fue descubierta como patógeno debido al brote de neumonía que tuvo lugar durante la convención de la Legión Americana en el verano de 1976. *Legionella* es una bacteria con forma de varilla Gram negativa (Figura 28.11) con requerimientos nutricionales muy complejos, incluyendo un inusualmente alto requerimiento de hierro, y no se encuentra relacionada con ningún otro patógeno asociado con infecciones respiratorias. *Legionella* puede ser detectada mediante técnicas de inmunofluorescencia (*véase* Sección 24.10), y puede ser aislada de medios tanto terrestres como acuáticos y de pacientes que sufren legionelosis.

Legionella está presente en bajo número en lagos, ríos y suelos. Es relativamente resistente al calor y a la cloración y, por ello, también se puede distribuir a través de los sistemas de abastecimiento de agua. Es comúnmente encontrada en grandes cantidades en torres de refrigeración y condensadores de evaporación de los grandes sistemas de aire acondicionado. El patógeno crece en el agua y se disemina a través de los aerosoles. La infección en humanos se produce a través de las gotitas de aerosoles que hay en el aire, y no ocurre de persona a persona. Múltiples brotes de legionelosis tienden a ocurrir en los últimos meses del verano, cuando los aparatos de aire acondicionado son extensivamente empleados.



Carey S. Callaway

Figura 28.11 Micrografía al microscopio electrónico de transmisión de *Legionella pneumophila*. Las células son de aproximadamente 0,6 µm de diámetro.

Legionella también ha sido localizada en tanques de agua caliente donde crece a elevadas concentraciones en el agua caliente (35-40°C) y estancada. Estudios epidemiológicos actuales indican que las infecciones por *Legionella* ocurren en cualquier época del año, primariamente como resultado de los aerosoles generados por los sistemas de calentamiento y enfriamiento, y prácticas tan comunes como el ducharse o bañarse. De todos modos, la incidencia registrada de casos de legionelosis se ha mantenido constante (Figura 28.12), pero probablemente más del 90% de los casos no son diagnosticados o apropiadamente registrados. La prevención de la legionelosis debe ser abordada con la mejora en el mantenimiento y diseño de los sistemas de calentamiento y enfriamiento que necesitan agua para su funcionamiento, y de los sistemas de distribución de agua. *Legionella pneumophila* puede ser eliminada de la distribución de agua por hipercloración o por calentamiento a >63°C.

Patogénesis

Legionella es un parásito intracelular que invade y crece en los macrófagos alveolares y en los monocitos (*véase* Sección 22.2). Las infecciones son a menudo asintomáticas o producen un ligero catarro, dolor de garganta, ligero dolor de cabeza y fiebre. Estos suaves y autolimitantes casos, conocidos como *fiebre Pontiac*, no requieren tratamiento y se resuelven de 2 a 5 días. Sin embargo, infecciones más serias que desencade-

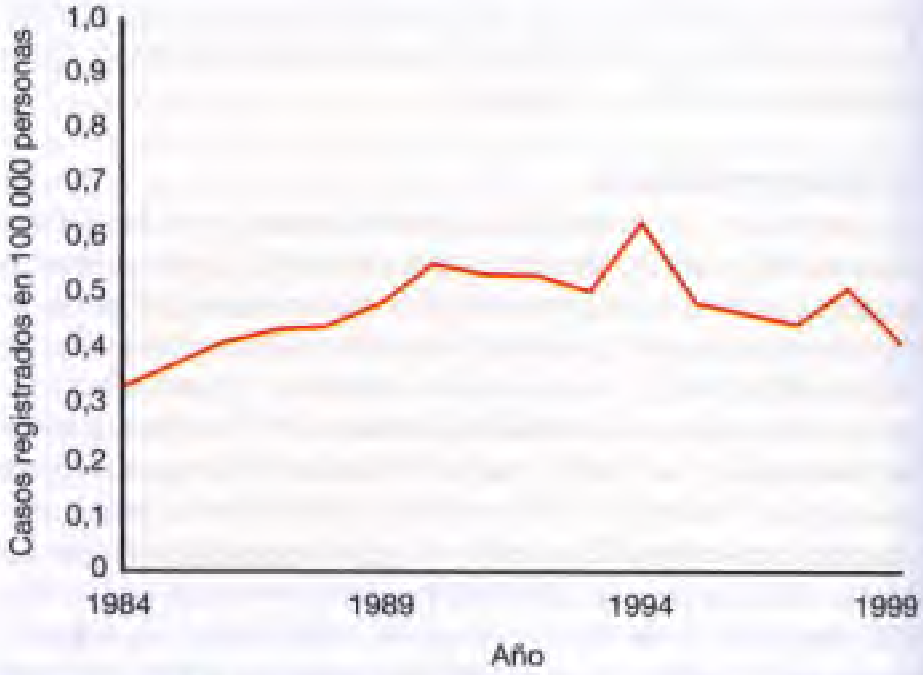


Figura 28.12 Incidencia anual de legionelosis en los Estados Unidos. Nótese la tendencia estable sin significantes descensos en la incidencia total en los últimos años. En 1999 el número total de casos registrados de legionelosis fue de 1108. Los datos son de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades, Atlanta, GA, EE.UU.

nan casos de neumonía, a menudo ocurren en pacientes de avanzada edad, cuya resistencia ha sido previamente comprometida. Algunos serotipos de *Legionella* (se conocen más de diez) están estrechamente relacionados con la producción de neumonía. Antes de la aparición de la neumonía, son comunes los desórdenes intestinales, seguidos de fiebre alta, escalofríos y dolor muscular. Estos síntomas preceden a la tos seca, y los dolores de pecho y abdominales característicos de la legionelosis. La muerte aparece en más del 10% de los casos y es habitualmente debida a fallos respiratorios.

Diagnóstico y tratamiento

La detección clínica de *Legionella pneumophila* se hace normalmente por cultivo a partir de exudados bronquiales, líquido pleural u otros fluidos corporales. Pruebas serológicas (anticuerpos) se usan como pruebas retrospectivas de infecciones por *Legionella* (*véase* Sección 24.7). Como ayuda a la diagnosis, los antígenos de *Legionella* pueden ser detectados, a veces, en la orina del paciente. *Legionella pneumophila* es sensible a los antibióticos rifampina y eritromicina. La administración intravenosa de eritromicina es el tratamiento de elección en la mayoría de los casos.

✓ 28.7 Revisión de conceptos

Legionella pneumophila es un patógeno respiratorio que causa la legionelosis y la fiebre de Pontiac. *L. pneumophila* crece hasta grandes concentraciones en el agua templada y se esparce mediante aerosoles. La incidencia de la legionelosis no está decreciendo.

- ✓ Indique la fuente de *Legionella pneumophila*.
- ✓ Indique medidas específicas para el control de *Legionella pneumophila*.

28.8 Fiebre tifoidea y otras enfermedades transmitidas por el agua

Gran variedad de bacterias, virus y protozoos pueden producir enfermedades que son transmitidas por fuentes comunes de abastecimiento de agua. Estas enfermedades son una importante causa de morbilidad, especialmente en los países en desarrollo. Aquí vamos a discutir brevemente algunas de estas importantes enfermedades transmitidas por el agua.

Fiebre tifoidea

A escala global, la bacteria patógena más importante transmitida por el agua es *Salmonella typhi*, agente etiológico de la fiebre tifoidea; y *Vibrio cholerae*, agente etiológico del cólera, como ya se señaló previamente. Aunque *Salmonella typhi* también puede ser transmitida a través de alimentos contaminados (*véase* Sección 29.6) y por contacto directo con los individuos infectados [*véase* Capítulo 25, recuadro, «El trágico caso de María Tifoidea (Mary Typhoid)»], aunque la vía de transmisión más importante es el agua. Afortunadamente la fiebre tifoidea ha sido prácticamente erradicada en los países desarrollados, especialmente debido a la potabilización del agua. En Estados Unidos se declaran menos de 400 casos anuales pero, como ya se comentó en la Sección 28.1, la fiebre tifoidea fue uno de los mayores problemas de salud pública antes de que el agua destinada al consumo fuese filtrada y clorada rutinariamente. Sin embargo, algunos fallos en los sistemas de tratamiento, contaminación del agua durante las inundaciones, terremotos y otros desastres, o contaminación de la red de agua potable por filtraciones de la red de aguas residuales, pueden producir la aparición de epidemias de fiebre tifoidea.

Virus

Los virus también se transmiten por el agua y producen enfermedades en el hombre. Frecuentemente algunos enterovirus como los poliovirus (*véase* Sección 16.7), virus del tipo Norwalk (*véase* Tabla 25.5) o virus de la hepatitis A (*véase* Sección 26.11) llegan al agua a través de las heces. El agente vírico más importante es el poliovirus, si bien los poliovirus han sido eliminados del hemisferio occidental (*véase* Sección 25.8). Aunque los virus pueden sobrevivir en el agua durante periodos de tiempo relativamente elevados, son fácilmente neutralizados por los tratamientos habituales de potabilización como la cloración. El mantenimiento de 0,6 partes por millón (ppm) de cloro en el agua (Sección 28.3) asegura la neutralización de los virus en la misma.

Amebiasis

Existen numerosas amebas capaces de habitar en los tejidos del hombre y de otros vertebrados, normalmente en la cavidad oral o en el tracto intestinal, algunas de las cuales son patógenas. Ya hablamos de las propiedades generales de las amebas dentro de los protozoos, en la Sección 14.9.

En el mundo, *Entamoeba hystolytica* es un protozoo patógeno muy común que se transmite por el agua y ocasionalmente por los alimentos (Figura 28.13). *E. hystolytica* es una ameba *anaeróbica*, cuyos trofozoides carecen de mitocondrias. Como *Giardia*, los trofozoides de *E. hystolytica* producen quistes. Los quistes son los responsables de la infestación y su germinación ocurre en el intestino, donde las células de la ameba crecen tanto dentro como sobre las células epiteliales de la mucosa. Muchas infecciones son asintomáticas, pero un crecimiento continuado puede dar lu-

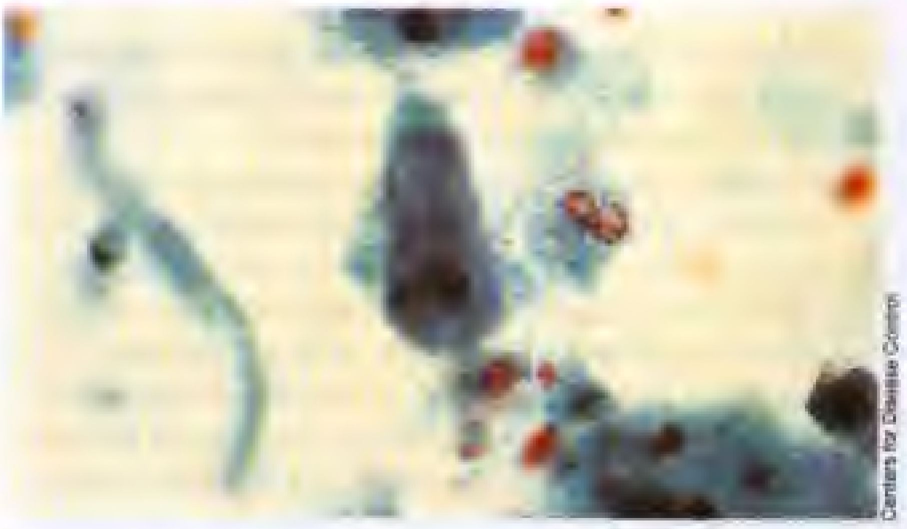

Centers for Disease Control

Figura 28.13 El trofozoide de *Entamoeba histolytica*, la ameba que causa amebiasis. Las estructuras rojas pequeñas son glóbulos rojos.

gar a la invasión y ulceración de la mucosa intestinal, dando lugar a diarrea y calambres intestinales. La diarrea puede progresar e invadir las paredes del intestino, produciendo un cuadro clínico denominado *disentería*, caracterizada por inflamación intestinal, fiebre y presencia de sangre y mucosidad en las heces. Si no es convenientemente tratada, los trofozoides invasivos de *E. hystolytica* pueden invadir el hígado e incluso los pulmones y el cerebro. El crecimiento en dichas localizaciones causa accesos graves y muerte. En el mundo, más de 100 000 personas mueren cada año de disentería invasiva producida por amebas. Esta enfermedad es extremadamente común en los países tropicales y subtropicales de todo el mundo; al menos 50 millones de personas padecen diarreas sintomáticas anualmente y hasta 10 veces más muestran evidencias de infección asintomática. En los Estados Unidos, hay varios cientos de casos al año, la mayoría de los cuales tienen lugar en las zonas fronterizas del sureste.

La amebiasis producida por *E. hystolytica* puede tratarse con dehidroemetina en el caso de enfermedad invasiva y con furoato de diloxanida en algunos casos asintomáticos, como en individuos con el sistema inmunitario comprometido; no obstante los fármacos frente a las amebas no son universalmente efectivos. La curación se produce de forma espontánea, lo que sugiere que el sistema inmunitario del hospedador tiene una función importante en las fases finales de la infección. Aún así, la inmunización protectora no queda garantizada después de la primera infección, ya que la reinfección es bastante común. Esta enfermedad tiene una incidencia muy reducida en países con un tratamiento apropiado de las aguas residuales. Un tratamiento inadecuado de las aguas residuales, así como el consumo de aguas superficiales sin tratar, son los principales responsables de las infecciones.

El diagnóstico de laboratorio se basa en demostrar la presencia de quistes de *E. hystolytica* en heces, de trofozoitos en tejidos o la presencia en la sangre de anticuerpos frente a *E. hystolytica*, a través de ensayos de tipo ELISA (*véase* Sección 24.11).

Naegleria fowleri también puede producir amebiasis, pero en una forma muy diferente. *N. fowleri* es una ameba de vida libre que se encuentra en el suelo y en el agua corriente. Las infecciones por *N. fowleri* suelen ser el resultado de baños en aguas templadas contaminadas, tales como fuentes de aguas termales y ríos en verano. La ameba de vida libre entra en el cuerpo a través de la nariz y se acantona directamente en el cerebro. Ahí la ameba se propaga, causando hemorragias generalizadas y daño cerebral. Este cuadro clínico se conoce como **meningoencefalitis.** La muerte tiene lugar en una semana. En la pasada década, hubo 18 brotes de meningoencefalitis debido a la exposición a aguas de recreo contaminadas en los Estados Unidos (Tabla 28.2). En 1998, hubo 4 brotes, cada uno de ellos en un único niño (edades entre 3 y 14 años) que nadaban o jugaban en lagos o ríos en verano. Las cuatro víctimas murieron.

El diagnóstico de la infección por *N. fowleri* requiere la observación de la ameba en el fluido cerebroespinal. Si se hace un diagnóstico rápidamente, la anfotericina B puede emplearse con éxito en el tratamiento de esta infección.

✓ 28.8 Revisión de conceptos

La fiebre tifoidea, las infecciones víricas y las amebiasis son enfermedades importantes transmitidas por el agua. La fiebre tifoidea y las enfermedades causadas por los virus, aunque muy comunes en países en vías de desarrollo, pueden ser fácilmente controladas mediante un apropiado tratamiento de las aguas. La disentería producida por las amebas es un problema a escala mundial que afecta a millones de personas. La meningoencefalitis es una rara pero seria condición causada por *Naegleria*.

- ✓ Explique el impacto que tendría una higienización apropiada del agua en la transmisión de enfermedades como la fiebre tifoidea y la polio, debidas a la contaminación fecal de las aguas.
- ✓ Defina un sistema eficaz para eliminar o reducir el número de casos de meningoencefalitis.

Preguntas de repaso

1. Defina los coliformes y la prueba de los coliformes. ¿Por qué se emplea la prueba de los coliformes para determinar la potabilidad del agua?
2. Diseñe la potabilización del agua residual de una planta típica. ¿Cuál es la reducción total en la DBO?
3. Enumere los métodos empleados para el procesamiento del agua potable. ¿Qué importantes contaminantes son eliminados en cada paso del proceso?
4. Identifique las fuentes más importantes de transmisión de infecciones por el agua. ¿Por qué las fuentes de infección son tan peligrosas para la salud pública?
5. ¿Por qué los antibióticos no son efectivos en el tratamiento del cólera?
6. La giardiasis y la criptospordiasis son importantes problemas de salud pública, incluso en áreas con estrictos estándares de calidad en el agua. Explique este fenómeno.
7. Describa las principales características de la legionelosis. ¿Qué distingue esta enfermedad de otras enfermedades transmitidas por el agua?
8. Numerosas enfermedades transmitidas por el agua han podido ser controladas gracias a las plantas de tratamiento de aguas. Identifique al menos dos de estas enfermedades e indique cómo han sido controladas.

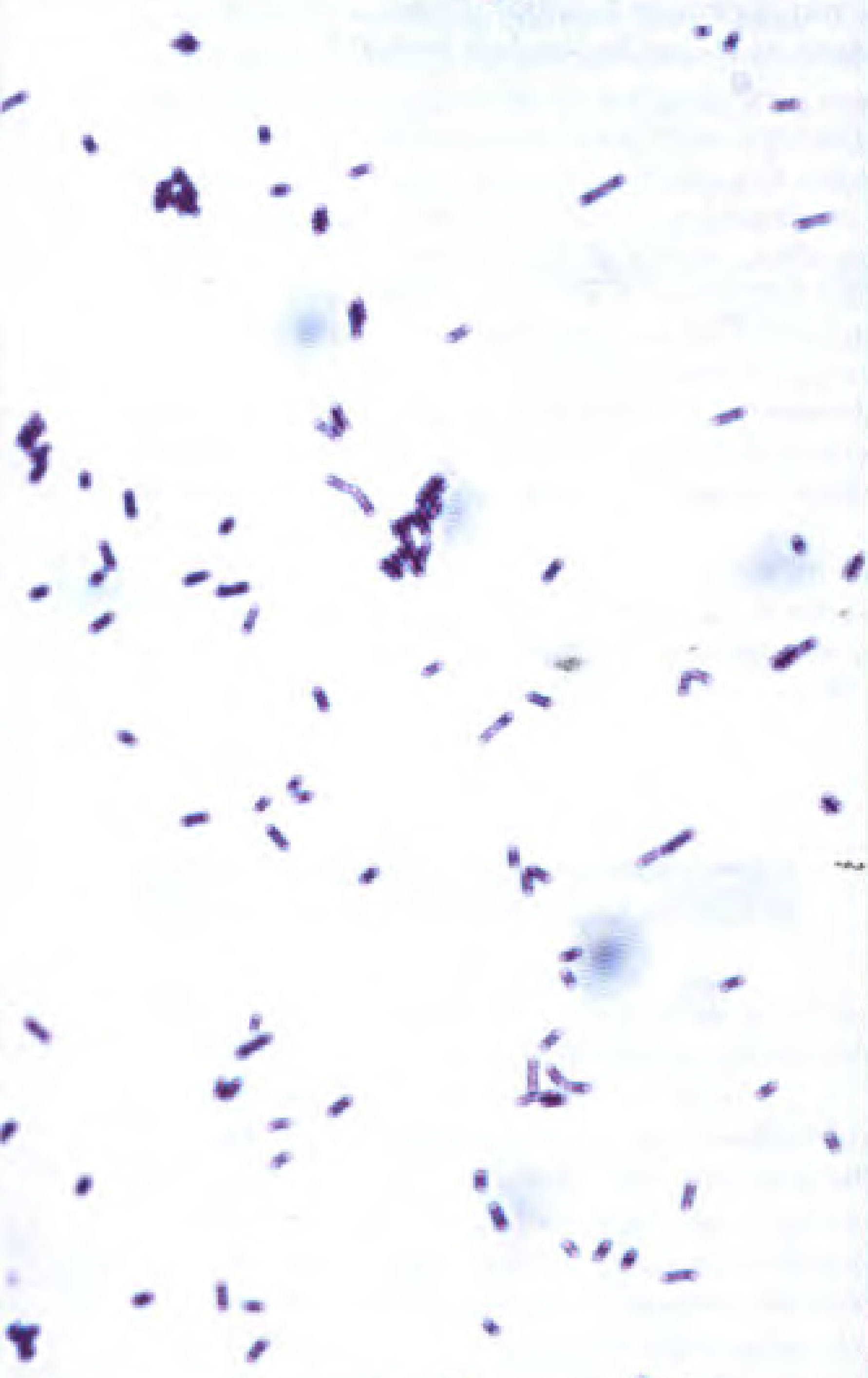
Ejercicios prácticos

1. En la prueba de coliformes, explique por qué el procedimiento de ésta no identifica los patógenos. ¿Sería posible realizar pruebas en el agua para identificar todos los patógenos transmitidos por ésta? ¿por qué sí o por qué no?
2. ¿Por qué la reducción de la DBO de las aguas residuales es el principal objetivo del tratamiento de las mismas? ¿Qué ocurre cuando la DBO no es significativamente reducida antes de ser vertida a lagos o ríos?
3. Identifique y explique los procedimientos empleados para eliminar los contaminantes químicos y biológicos del agua para el consumo humano. ¿Qué problema puede ocurrir si los métodos de potabilización químicos o biológicos fallan? No olvide tener en cuenta la pureza del agua sin tratar.
4. El gobierno federal de Estados Unidos ha definido unos estrictos estándares de agua potable. Estos estándares están regulados por la ley. Sin embargo, los estándares del agua para recreo no son tan estrictos. Explique por qué los estándares del agua destinada al recreo son más flexibles, y diseñe los estándares de calidad del agua de recreo para el área en que usted vive.
5. Explique si *Vibrio cholerae* puede o no causar epidemias de cólera en los Estados Unidos. Justifique su respuesta. Recuerde que *V. cholerae* se encuentra en las aguas del Golfo de México.
6. ¿Por qué las aguas superficiales se encuentran contaminadas con los quistes de varios protozoos? ¿Qué pasos deben tomar los responsables de la salud pública para remediar este problema?
7. Identifique los problemas potenciales en el diseño de aparatos de aire acondicionado o aparatos de ducha que permiten el crecimiento y desarrollo de *Legionella pneumophila*.
8. Comente los esquemas de tratamiento de aguas residuales y de agua destinada al consumo que deben tomarse para controlar enfermedades como la fiebre tifoidea. ¿Es posible eliminar *Salmonella typhi* como se ha hecho con el virus de la polio? ¿Podría ser posible o aconsejable en el caso de *Naegleria fowleri*? Explique por qué.

Las enfermedades transmitidas por alimentos son un importante área emergente de creciente interés para los microbiólogos. El consumo ampliamente generalizado de alimentos, preparados y empaquetados, «listos para llevar», supone una tremenda responsabilidad para las instalaciones dedicadas a la preparación y distribución de alimentos, a fin de mantener altos estándares de calidad y evitar la contaminación por organismos tan comunes como *Clostridium perfringens*, mostrado aquí. Las infecciones o intoxicaciones alimentarias originadas a partir de una fuente común de producción pueden afectar a cientos de personas.

29

CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS Y ENFERMEDADES MICROBIANAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS



I CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS Y CRECIMIENTO MICROBIANO 943

29.1 Crecimiento microbiano y alteración de los alimentos 943
29.2 Conservación de los alimentos 944

II ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS 947

29.3 Enfermedades transmitidas por los alimentos y detección de microorganismos 947
29.4 Intoxicación alimentaria por estafilococos 948
29.5 Intoxicación alimentaria por clostridios 949
29.6 Salmonelosis 951
29.7 Cepas patógenas de *Escherichia coli* 952
29.8 *Campylobacter* 953
29.9 Listeriosis 953
29.10 Otras enfermedades infecciosas transmitidas por alimentos 954

Glosario

Actividad de agua (a_w) disponibilidad de agua para su uso en procesos metabólicos

Alimentos alterados cambio en las características organolépticas: apariencia, olor, o sabor, de un alimento que le hace inaceptable para su consumo

Alimentos no perecederos (estables) alimentos con escasa actividad de agua que disponen de un largo periodo de conservación y son resistentes a la alteración por microorganismos

Alimentos perecederos alimentos frescos generalmente con alta actividad de agua, que disponen de periodos de conservación muy cortos debido a una potencial alteración por el crecimiento de microorganismos

Alimentos semiperecederos alimentos de intermedia actividad de agua que disponen de un tiempo de conservación limitado debido a la potencial alteración por el crecimiento de microorganismos

Botulismo intoxicación alimentaria debida a la ingestión de alimentos que contienen la toxina botulínica producida por *Clostridium botulinum*

Envasado proceso de almacenamiento de alimentos en un recipiente cerrado y posterior calentamiento para destruir los microorganismos vivos

Escabeche proceso de acidificación de los alimentos para prevenir el crecimiento de microorganismos y su alteración

Infección alimentaria enfermedad causada por una infección resultante de la ingestión de alimentos contaminados

Intoxicación alimentaria enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos que contienen toxinas microbianas

Irradiación exposición de los alimentos a una radiación ionizante con el propósito de inhibir el crecimiento de microorganismos, insectos o de retardar el crecimiento y/o maduración

Liofilización proceso de eliminación del agua de alimentos congelados bajo condiciones de vacío

Listeriosis infección alimentaria intestinal causada por *Listeria monocytogenes* que puede producir septicemia y meningitis

Salmonelosis enterocolitis causada por alguno de los 1400 serotipos de *Salmonella* spp.

Los microorganismos son factores importantes de nuestros alimentos. Gran variedad de los alimentos que consumimos son producidos o mejorados por la acción microbiana, por ejemplo: productos de la leche como queso, mantequilla, nata y yogurt son producidos por fermentaciones microbianas. El chucrut es un alimento vegetal fermentado. Productos cárnicos como ciertas salchichas y patés usan fermentaciones microbianas. El vinagre de sidra es producido por una bacteria del ácido láctico (*véase* Sección 30.10). Las bebidas alcohólicas son producidas por procesos de fermentación donde se usan levaduras (*véase* Sección 30.13). Comentaremos el empleo de microorganismos en la producción de alimentos a escala industrial en el Capítulo 30.

En el presente capítulo, nos centraremos en los aspectos negativos del crecimiento microbiano en los alimentos. El crecimiento incontrolado y no deseado de microorganismos destruye enormes cantidades de alimentos, causando importantes pérdidas económicas así como de nutrientes. El consumo de alimentos contaminados con un determinado microorganismo o los productos que éstos generan pueden también producir enfermedades muy serias tales como infecciones o intoxicaciones alimentarias.

I CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS Y CRECIMIENTO MICROBIANO

Los microorganismos son ubicuos en nuestro ambiente, pudiéndose encontrar en el agua, aire y especialmente en los alimentos. Los alimentos frescos, la mayoría de los preparados e incluso algunas veces los alimentos preservados, se contaminan con microorganismos. Primero vamos a hablar de los microorganismos importantes como agentes que deterioran los alimentos, y después presentaremos una variedad de métodos empleados para el control de su crecimiento y conservación del alimento.

29.1 Crecimiento microbiano y alteración de los alimentos

Una gran variedad de microorganismos son capaces de colonizar y crecer en los alimentos. Muchos alimentos proporcionan un medio apto para el crecimiento de los microorganismos, y el crecimiento de los mismos produce una reducción en la calidad y disponibilidad de los mismos.

Alteración de los alimentos

Se entiende por **alteración de los alimentos** el cambio en las características organolépticas, es decir, en la apariencia, olor o sabor que los hace inaceptables para el consumo. Los alimentos alterados no tienen necesariamente que ser peligrosos para la salud, pero en algunos casos la alteración es producida por organismos patógenos. Los alimentos alterados generalmente se consideran no aptos para el consumo y no pueden distribuirse o consumirse. La alteración de los alimentos causa importantes pérdidas económicas a los productores, distribuidores e incluso a los consumidores, en forma de elevación de precios y restricción de abastecimiento.

Dado que los alimentos son material orgánico, pueden proveer nutrientes para el crecimiento de una amplia variedad de bacterias quimioorganotróficas. Las características físicas y químicas de los alimentos determinan su grado de susceptibilidad a la actividad microbiana. Con respecto a la alteración, los alimentos se pueden clasificar en tres categorías principales: (1) **alimentos perecederos,** tales como muchos alimentos frescos; (2) **alimentos semiperecederos,** tales como patatas y frutos secos; y (3) **alimentos no perecederos,** tales como la harina o el azúcar (Tabla 29.1). Estas categorías de alimentos se diferencian en cuanto al *conteni-*

TABLA 29.1 Clasificación de los alimentos según su conservación

Clasificación de los alimentos	Ejemplos
Muy perecedero	Carnes, pescado, aves, huevos, leche, la mayoría de las frutas y verduras
Semiperecedero	Patatas, algunas manzanas y frutos secos
No perecedero	Azúcar, harina, arroz y legumbres secas.

do de humedad, el cual se relaciona, como vimos en la Sección 6.12, con la actividad de agua a_w. Los alimentos no perecederos tienen una baja actividad de agua y pueden ser generalmente almacenados durante largos periodos de tiempo sin que se deterioren. Alimentos perecederos o semiperecederos son aquéllos con alta capacidad de agua. Estos alimentos deben ser almacenados bajo condiciones que ralenticen o detengan el crecimiento microbiano.

Los alimentos frescos son alterados por una amplia variedad de bacterias y de hongos, y cada tipo de alimento fresco es colonizado típicamente por un microorganismo en particular (Tabla 29.2). Debido a que las propiedades químicas de los alimentos es muy variable, diferentes alimentos son colonizados por aquellos microorganismos que son mejores a la hora de aprovechar los nutrientes disponibles.

Por ejemplo, las bacterias entéricas como *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia* son patógenos potenciales que viven en el intestino de los animales, y están raramente implicados en la alteración de frutas o vegetales, pero sí en la de la carne. En los mataderos, los contenidos intestinales, incluyendo las bacterias vivas, pueden contaminar la carne. De igual manera, las bacterias ácido-lácticas de los productos lácteos son las mayores responsables de la alteración de los mismos. Especies de *Pseudomonas* se encuentran en el suelo y en los animales, y son responsables habituales de la alteración de los alimentos frescos.

El crecimiento bacteriano en los alimentos sigue el patrón estándar del crecimiento bacteriano (*véanse* Secciones 6.3 y 6.4). La fase de latencia puede ser de duración variable, dependiendo del organismo contaminante y su previa historia de crecimiento. La tasa de crecimiento durante la fase exponencial depende de la *temperatura*, el *valor nutritivo del alimento* y otras condiciones de crecimiento. El tiempo requerido para que la densidad de población de la bacteria alcance un nivel significativo en un determinado producto alimenticio depende del inóculo inicial y de la tasa de crecimiento durante la fase exponencial. Los efectos de la alteración del alimento son sólo observables cuando la densidad de población del microorganismo alcanza un nivel sustancial. Incluso durante gran parte del crecimiento exponencial la densidad de la población es tan baja que no se observa efecto alguno. Solamente en los últimos momentos de esta fase se observa la alteración (*véase* Sección 6.4). Así, durante la mayor parte del crecimiento microbiano sobre los alimentos no se detecta fácilmente ningún cambio en la calidad de los mismos.

✓ 29.1 Revisión de conceptos

Los alimentos a menudo se deterioran debido a la contaminación por microorganismos. Los alimentos son muy variables en cuanto a su sensibilidad al crecimiento microbiano, dependiendo de su contenido de nutrientes y agua. Cada categoría individual de alimentos presenta patrones específicos de alteración y de microorganismos. Muchos microorganismos responsables de la alteración de los alimentos son también potencialmente patógenos.

- ✓ Enumere las principales categorías de alimentos y defínalos con respecto a su contenido de aguas.
- ✓ Identifique al menos tres géneros bacterianos que produzcan tanto la alteración de alimentos como enfermedades en el hombre.

29.2 Conservación de los alimentos

Vamos a examinar diferentes métodos de conservación y almacenamiento de alimentos que inhiben o detienen el crecimiento de los organismos que causan la alteración de los alimentos y de los patógenos del hombre.

Temperatura

Además de la humedad, uno de los factores más cruciales que afectan al crecimiento de los microorganismos en los ali-

TABLA 29.2 Alteración microbiana de los alimentos frescos[a]

Alimento	Tipo de microorganismo	Género del organismo que causa la alteración
Frutas y verduras	Bacterias	*Erwinia*, ***Pseudomonas*, *Corynebacterium*** (principalmente patógenos vegetales, raramente en frutas)
	Hongos	*Aspergillus*, *Botrytis*, *Geotrichium*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Phytophora*, varias levaduras
Carne fresca, aves y mariscos	Bacterias	*Acinetobacter*, *Aeromonas*, ***Pseudomonas***, *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, ***Proteus*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Campylobacter*, *Listeria***
	Hongos	*Cladosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Geotrichium*, ***Sporotrichium*, *Candida***, *Torula*, *Rhodotorula*
Leche	Bacterias	***Streptococcus***, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, ***Pseudomonas*, *Proteus***
Alimentos muy azucarados	Bacterias	***Clostridium*, *Bacillus***, *Flavobacterium*
	Hongos	*Saccharomyces*, *Torula*, *Penicillium*

[a] Los organismos citados son los observados más frecuentemente como agentes causantes de la alteración de alimentos frescos o perecederos. Los géneros en negrita contienen posibles microorganismos patógenos para el hombre.

mentos es la temperatura (*véase* Sección 6.9). En general, *baja* temperatura de almacenamiento deriva en un retraso de la alteración: sin embargo hay un grupo de microorganismos *criotolerantes* (resistentes al frío), que pueden sobrevivir y crecer a las temperaturas de refrigeración de los alimentos. No obstante, el almacenamiento de alimentos perecederos durante largos periodos de tiempo (mucho mayores que algunos días) es posible a temperaturas por debajo de la congelación. La congelación y descongelación altera la estructura de muchos alimentos. Por ello la congelación no es un sistema aceptable de conservación de muchos alimentos frescos, pero si es ampliamente empleado para otros como la carne, y muchas frutas y verduras. Los congeladores más empleados proporcionan una temperatura de −20°C. A esta temperatura el almacenamiento es posible durante semanas o meses, aunque el crecimiento microbiano puede ocurrir en pequeñas burbujas de agua atrapadas en la masa congelada. Para la conservación a largo tiempo, son necesarias temperaturas de −80°C (temperatura del hielo seco). El mantenimiento de esta temperatura es caro y consecuentemente no se usa para el almacenamiento habitual de alimentos.

Acidez

Otro factor importante que afecta al crecimiento microbiano en los alimentos es el pH o la acidez. Los alimentos son variables en cuanto a su pH, pero la mayoría son neutros o ácidos. Los microorganismos varían en cuanto a su capacidad para crecer bajo condiciones ácidas, pero condiciones de pH 5 o menor inhiben el crecimiento de la mayoría de los microorganismos que determinan la alteración de los alimentos (*véase* Sección 6.11). Además, la acidificación es a menudo usada para la conservación de los alimentos, en un proceso denominado **escabechado**. El vinagre, que es ácido acético diluido, se añade en el proceso de escabechado (el vinagre es un producto de la fermentación de las bacterias ácido-acéticas; su producción industrial será tratada en la Sección 30.10). Además del vinagre, en el proceso de escabechado se emplean grandes cantidades de sal o de azúcar para reducir la cantidad de agua disponible (*véase* más adelante) y por tanto inhibir el crecimiento microbiano. Alimentos escabechados típicos son: pepinos (dulces o amargos), pimientos, carne, pescado y frutas. En algunos casos, el ácido puede aparecer en los alimentos como consecuencia del crecimiento microbiano y el producto es denominado *alimento fermentado*, tal es el caso de la col, el yogurt, el queso y la leche agria. Los microorganismos relacionados con las fermentación de los alimentos incluyen las bacterias ácido acéticas, y las bacterias ácido propiónico. Estas bacterias no pueden crecer por debajo de pH 4, lo que implica que la fermentación de los alimentos es un proceso autolimitado.

Actividad de agua

La **actividad de agua (a_w)** es el agua disponible para el metabolismo de los microorganismos. Dado que los microorganismos no son capaces de crecer en condiciones de baja actividad de agua (escasa disponibilidad de agua), el crecimiento microbiano puede ser controlado mediante la reducción del contenido de agua en los alimentos a través de la deshidratación o la adición de altas concentraciones de solutos tales como agua o azúcar (*véase* Sección 6.12). El calor, tanto natural como artificial, es a menudo empleado para la deshidratación, aunque el proceso físico menos dañino empleado para la deshidratación de los alimentos es la **liofilización (congelación-deshidratación)**, en la cual los alimentos son congelados y el agua es eliminada por exposición al vacío. Leche, carne, pescado, frutas, huevos y otros alimentos económicamente muy importantes son comúnmente conservados por alguna forma de deshidratación.

Numerosos alimentos se conservan por la adición de sal o azúcar con el fin de reducir la actividad de agua. Los alimentos conservados mediante la adición de azúcar son principalmente frutas (mermeladas, gelatinas y conservas). Los productos salados son principalmente carnes y pescados. Las salchichas y el jamón son conservados con sal, aunque los productos individuales varían en la actividad de agua dependiendo de la cantidad de sal añadida y de cuanto producto se haya desecado.

Enlatado

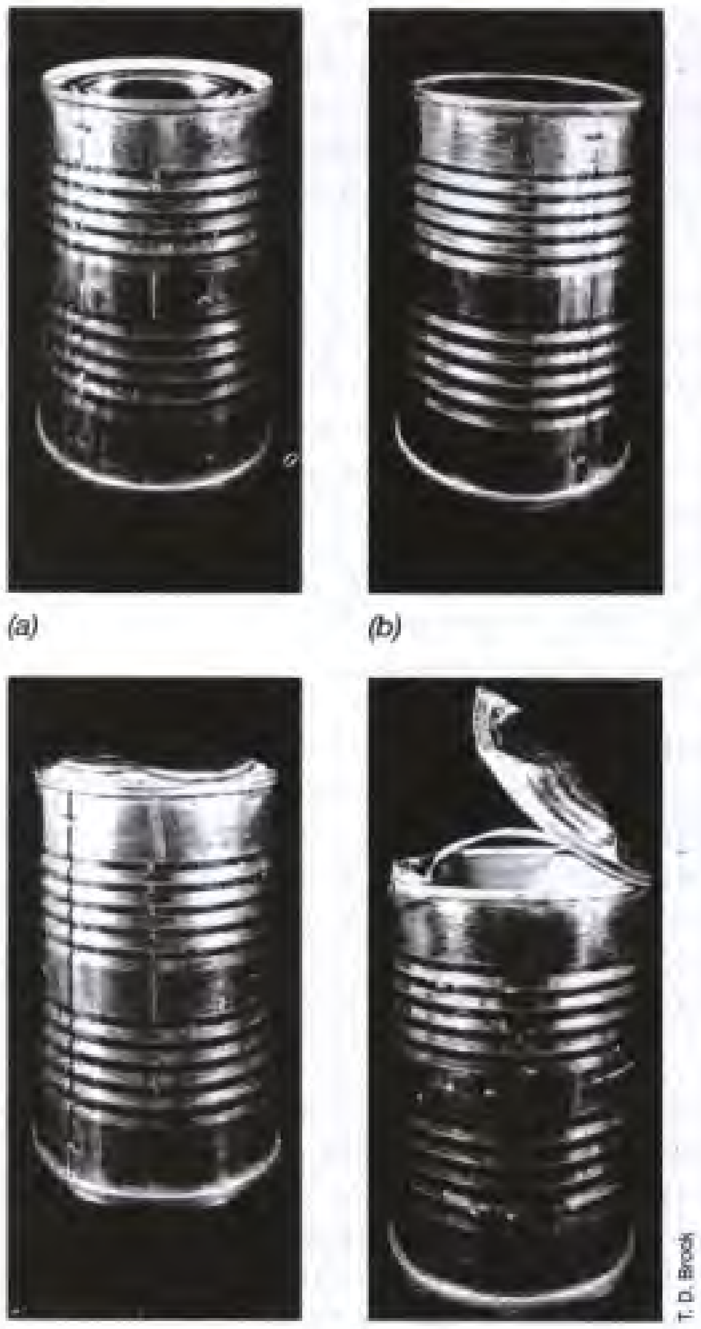
El **enlatado** es el proceso por el cual los alimentos se introducen en contenedores tales como latas o tarros de cristal, y son calentados para eliminar todos los organismos vivos, o al menos para asegurar que no habrá crecimiento de organismos residuales. Cuando el recipiente se cierra y se calienta apropiadamente, los alimentos deben mantenerse estables y sin deteriorarse de forma indefinida, incluso cuando se almacenan en ausencia de refrigeración.

La relación temperatura-tiempo en el enlatado depende del tipo de alimento, su pH, el tamaño del contendor y la consistencia o densidad del alimento. Debido a que el calor ha de penetrar completamente hasta el centro del alimento dentro de la lata, los tiempos de calentamiento deben ser mayores para recipientes de gran tamaño o alimentos muy densos. Los alimentos ácidos pueden enlatarse con eficacia calentando hasta 100°C, mientras que los alimentos no ácidos deben calentarse hasta temperaturas del autoclave (121°C). Desafortunadamente, los tiempos de calentamiento necesarios para asegurarse de la absoluta esterilidad del producto son demasiado largos (*véase* Sección 20.1) y pueden hacer variar las cualidades del alimento haciéndolo no apto para el consumo o reduciendo sus cualidades nutritivas; por tanto, los alimentos enlatados pueden no estar debidamente esterilizados.

El ambiente en el interior del recipiente es anóxico y el crecimiento microbiano en un alimento enlatado es frecuentemente consecuencia de organismos fermentadores que producen grandes cantidades de gas. Este recipiente sufre por tanto una elevación de la presión interior, dando lugar a abultamientos o, en casos extremos, a la explosión del recipiente (Figura 29.1) Debido a que muchas de las bacterias anaerobias que crecen en los alimentos enlatados son bacterias del género *Clostridium*, productoras de toxinas (*véanse* Sección 21.10, Tabla 29.2 y Sección 29.5), los alimentos de un recipiente visiblemente alterados nunca deben consumirse; sin embargo la ausencia aparente de gas no es garantía absoluta de que el alimento pueda ser consumido.

Conservación química de los alimentos

Diferentes sustancias químicas se usan comercialmente para controlar el crecimiento de los microorganismos en los alimentos. Éstos se clasifican por la Food and Drug Admis-



(a) (b) (c) (d)

Figura 29.1 Cambios en latas debido a la alteración microbiana. (a) Lata normal; la parte superior de la lata está ligeramente abombada hacia en interior debido a la presión negativa del mismo (vacío en el interior). (b) Abombado debido a una pequeña producción de gas. Nótese que la parte superior está ligeramente distendida. (c) Abombado debido a una extensa producción de gas. (d) La lata mostrada en (c) sufrió un golpe y la presión interior produjo una violenta explosión, separando la tapa de la misma.

TABLA 29.3 Productos químicos empleados como conservantes

Sustancia química	Alimentos
Propionato de sodio o calcio	Pan
Benzoato sódico	Bebidas carbonatadas, frutas, zumos de frutas, escabechados, margarina y conservas
Ácido sórbico	Productos cítricos, queso, escabechados y ensaladas
Dióxido de sulfuro, sulfitos y bisulfitos	Frutas deshidratadas y vegetales, vino
Formaldehído (del proceso de ahumado)	Carne y pescado
Óxidos de etileno y propileno	Especias, frutas deshidratadas y frutos secos
Nitrito sódico	Jamón ahumado y bacon

tration (FDA) de Estados Unidos como «generalmente reconocidos como saludables» y tienen amplia aplicación en la industria alimentaria (Tabla 29.3). Muchas de estas sustancias químicas, como el propionato sódico, han sido empleadas durante muchos años sin evidencia de toxicidad para los humanos. Otras como los nitritos (precursor carcinógeno), óxidos de etileno o propileno (mutágenos; *véase* Sección 10.4), o antibióticos (desarrollo de patógenos resistentes a los antibióticos; *véase* Sección 20.12), son más controvertidos debido a evidencias que indican que estos aditivos son perjudiciales para la salud humana.

Debido a lo largo y costoso de los programas para probar cualquier nueva sustancia química propuesta como conservador de alimentos, es bastante improbable que se añadan nuevos compuestos a la lista de conservadores de alimentos, que aparece en la Tabla 29.3, en un futuro cercano.

Irradiación

La **irradiación** de los alimentos empleando radiaciones ionizantes es actualmente un método estándar para reducir la contaminación bacteriana, fúngica e incluso por insectos (*véase* Sección 20.2). En la Tabla 29.4 se recogen algunos alimentos en los que ha sido aprobado el tratamiento por irradiación. Alimentos como las especias son rutinariamente irradiados. En Estados Unidos, los productos a base de carne fresca como hamburguesas y las aves son actualmente irradiadas para limitar la contaminación con *Escherichia coli* O157: H7, y otros patógenos entéricos (hamburguesas) y *Campylobacter jejuni* (aves). Para la irradiación de alimentos se emplean rayos gamma generados a partir de ^{60}Co o ^{137}Cs. La dosis varía considerablemente dependiendo de cada categoría de alimentos y el propósito. Por ejemplo, una dosis de 44 kiloGrays (kGys) se usa para esterilizar los productos de la carne empleados por la NASA en los vuelos espaciales, siendo casi 10 veces más alto que los 4,5 kGy usados para controlar los patógenos en las hamburguesas (Tabla 29.4). En los Estados Unidos una etiqueta de información al consumidor debe indicar que esos alimentos han sido irradiados.

✓ 29.2 *Revisión de conceptos*

La microbiología de los alimentos estudia los métodos para limitar la alteración y el crecimiento de los microorganismos causantes de enfermedades en los alimentos durante el proceso de almacenamiento. Los alimentos varían mucho en cuanto a su sensibilidad al crecimiento microbiano, dependiendo de su contenido de nutrientes, disponibilidad de agua y pH. El crecimiento de microorganismos en alimentos perecederos puede ser controlado mediante refrigeración, congelación, envasado, escabechado, deshidratación, conservación química o irradiación.

- ✓ Describa al menos cuatro métodos para la conservación de los alimentos. ¿Cómo limita cada método el crecimiento de los microorganismos?
- ✓ ¿Los microorganismos que causan la alteración de los alimentos son también patógenos? Dé ejemplos que apoyen su respuesta.

TABLA 29.4 Alimentos irradiados por categorías y finalidad[a]

Categoría de alimentos	Finalidad de la irradiación
Cerdo fresco	Control del parásito *Trichinella spiralis*
Fruta y verduras frescas	Inhibición del crecimiento y la maduración
Especias deshidratadas, hierbas y mezclas aromáticas	Desinfección microbiana
Carne cruda refrigerada o congelada, incluyendo carne picada	Control de patógenos, extensión de la viabilidad del producto
Carnes empaquetadas y congeladas usadas por los programas de la NASA	Esterilización
Preparados enzimáticos secos o deshidratados (por ejemplo: ablandador de carne)	Desinfección microbiana
Productos de aves o aves congeladas	Control de los patógenos

[a] Las leyes de etiquetado en los Estados Unidos obligan a indicar los alimentos que han sido irradiados, «tratado con radiación» o «tratado por irradiación» además de la información requerida por el resto de las normas.

II ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS

El fallo en la adecuada descontaminación y conservación de los alimentos puede permitir el crecimiento de patógenos, resultando en enfermedades con alta morbilidad y mortalidad. Al igual que las enfermedades transmitidas por el agua, las enfermedades transmitidas por los alimentos son fuente de enfermedades; una única fuente de alimentos contaminada puede afectar a un gran número de personas.

29.3 Enfermedades transmitidas por los alimentos y detección de microorganismos

Un resumen de las más importantes enfermedades transmitidas por los alimentos y los microorganismos que las producen se muestra en la Tabla 29.5. Estas enfermedades comunes pueden separarse en dos categorías, *intoxicación alimentaria* e *infección alimentaria*. Técnicas especiales para la detección de microorganismos son necesarias para los patógenos responsables de las enfermedades transmitidas por los alimentos.

Intoxicación alimentaria

La **intoxicación alimentaria** es la enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos que contienen toxinas generadas por microorganismos. Los microorganismos que producen estas toxinas no tienen que crecer en el hospedador y normalmente no están vivos en el momento en que los alimentos contaminados son consumidos. La enfermedad es debida a la ingestión y acción de la toxina activa. Hemos comentado previamente algunas de estas toxinas, principalmente las toxinas de *Clostridium botulinum* (*véase* Sección 21.10) y las toxinas (superantígenos) de *Staphylococcus aureus* (*véase* Sección 22.14).

Infecciones alimentarias

Las **infecciones alimentarias** son infecciones activas resultantes de la ingestión de un alimento contaminado con un patógeno. Además de la ingesta pasiva de toxinas, el alimento puede tener un número suficiente de microorganismos patógenos vivos como para causar infección y enfermedad en el hospedador. La infección alimentaria es una forma muy común de enfermedad transmitida por los alimentos (Tabla 29.5) la salmonela es un ejemplo. Muchos de estos agentes infecciosos también determinan enfermedades transmitidas por el agua (Capítulo 28).

Detección de microorganismos en los alimentos

Como ya se dijo en la Sección 29.1, los microorganismos están siempre presentes en los alimentos frescos. Dado que los patógenos pueden estar presentes junto con muchos otros organismos inocuos, se han desarrollado métodos para detectar los patógenos más importantes, tales como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Staphylococcus* y *Clostridium botulinum*. Ya discutimos en la Sección 24.13 el uso de sondas de ácidos nucleicos para la detección de patógenos específicos transmitidos por los alimentos. Para el estudio del crecimiento en alimentos no líquidos, se requiere un tratamiento previo para resuspender los microorganismo que están embebidos o atrapados en el alimento. El método más empleado es el batido a alta velocidad. Los alimentos deben ser examinados tan rápido como el proceso de tratamiento de las muestras lo permita, si no puede comenzarse en una hora desde el inicio del tratamiento, las muestras deben ser refrigeradas. Un alimentos congelado debe ser descongelado en su recipiente original en un refrigerador y examinado o cultivado tan pronto como la descongelación llegue a término. Las muestras pueden ser inoculadas en medios enriquecidos, seguidamente se llevan a medios diferenciales o selectivos para su aislamiento e identificación, como ya describimos para los patógenos humanos (*véase* Sección 24.1), o probados directamente para la presencia de patógenos usando los métodos basados en ácidos nucleicos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (*véase* Sección 24.13).

✓ 29.3 Revisión de conceptos

Las enfermedades transmitidas por los alimentos son las intoxicaciones alimentarias debidas a la presencia de toxinas de origen microbiano y las infecciones alimentarias debido al crecimiento e invasión de los microorganismos en el cuerpo. Técnicas especiales se emplean para detectar los microorganismos en los alimentos.

- ✓ Distinga entre intoxicación e infección alimentaria
- ✓ Describa la detección de un microorganismo a partir de un alimento sólido como la carne.

TABLA 29.5 Estimación anual de enfermedades transmitidas por los alimentos en los Estados Unidos

Organismo	Enfermedad[a]	Número por año	Alimentos
Bacterias			
Bacillus cereus	FP	27 000	Arroz y alimentos con almidón, alimentos con mucho azúcar
Campylobacter jejuni	FI	1 963 000	Aves, lacteos
Clostridium perfringens	FP	248 000	Carnes precocinadas, recalentadas, productos cárnicos
Escherichia coli O157:H7	FI	63 000	Carne, especialmente carne picada
Otros enteropatógenos *Escherichia coli*	FI	110 000	Carne, especialmente carne picada
Listeria monocytogenes	FI	2500	Carne y lácteos
Salmonella spp.	FI	1.340 000	Aves, carne, lácteos, huevos
Staphylococcus aureus	FP	185 000	Carne, postres
Streptococcus	FI	50 000	Lácteos, carne
Yersinia enterocolitica	FI	87 000	Carne de cerdo, leche
Resto de bacterias	FP y FI	102 000	
Total bacterias		**4 177 500**	
Parásitos			
Cryptosporidium parvum	FI	30 000	Carne cruda o sin cocinar
Cyclospora cayetanensis	FI	16 000	Productos frescos
Giardia lamblia	FI	200 000	Carne contaminada o infectada
Toxoplasma gondii	FI	113 000	Carne cruda o sin cocinar
Total parásitos		**359 000**	
Virus			
Virus de tipo Norwalk	FI	9 200 000	Moluscos con concha, y muchos otros alimentos
Resto de virus	FI	82 000	
Total virus		**9 282 000**	
Total de enfermedades transmitidas por los alimentos al año		**13 818 500**	

[a] FP, intoxicación alimentaria; FI, infección alimentaria. Las estimaciones están basadas en los datos cedidos por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, Atlanta, GA, EE.UU.

29.4 Intoxicación alimentaria por estafilococos

Una intoxicación alimentaria muy común es la causada por *Staphylococcus aureus.*

Biología y epidemiología

Staphylococcus aureus y otros miembros del género son cocos pequeños Gram positivos (*véase* Sección 12.19). Como ya se explicó en la Sección 26.9, los estafilococos se encuentran el la piel y en el tracto respiratorio de prácticamente todos los humanos y son a menudo patógenos oportunistas. *Staphylococcus aureus* se asocia frecuentemente con intoxicaciones alimentarias porque, mientras crece, produce diferentes enterotoxinas proteicas termoestables (Sección 21.11). Las enterotoxinas son liberadas en el medio colindante o en los alimentos; si el alimento que contiene la toxina es ingerido, aparecen en un plazo de 1 a 6 horas gastroenteritis caracterizadas por náuseas, vómitos y diarrea.

Cada año se estiman unos 85 000 casos de intoxicaciones alimentarias por estafilococos en Estados Unidos (Tabla 29.5). Los alimentos más comúnmente involucrados son pasteles rellenos de crema o natillas, aves, carne y productos cárnicos, huevos y ensaladas de carne, pudings y aliños de ensaladas. Si estos alimentos se mantienen refrigerados después de su preparación, generalmente se mantienen saludables, ya que el crecimiento de *Staphylococcus aureus* a bajas temperaturas se reduce notablemente. Sin embargo, los alimentos del tipo citado anteriormente, se mantienen en las cocinas a temperatura ambiente o en meriendas al aire libre. Los alimentos, si son inoculados con *Staphylococcus aureus* por un manipulador infectado, sufren una rápida invasión y producción de la enterotoxina. Incluso si los alimentos que contienen la enterotoxina son recalentados de nuevo antes de ser consumidos, la toxina es relativamente termoestable y se mantiene activa.

Patogénesis

Staphylococcus aureus produce 7 enterotoxinas diferentes: A, B, C1, C2, D y E. La enterotoxina A, un superantígeno, es la más frecuentemente relacionada con la intoxicación por estafilococos (*véase* Sección 22.14). Los superantígenos producen la estimulación de un gran número de células T, que liberan gran cantidad de citoquinas, activando una respuesta general de inflamación en el intestino que resulta en gastroenteritis, incluyendo una pérdida masiva de fluidos.

La toxina A de *Staphylococcus aureus* es un péptido pequeño de 30 000 de peso molecular codificado por un gen cromosómico. La clonación y secuenciación de este gen, el gen *ent*A, uno de los distintos genes que codifican enterotoxinas en *Staphylococcus aureus*, mostró que las toxinas están genéticamente relacionadas. Aunque el gen *ent*A está en el cromosoma de la bacteria, los de tipo B y C pueden encontrarse en plásmidos, transposones o bacteriófagos lisogénicos. Ya discutimos la importancia de los accesorios genéticos tales como plásmidos y bacteriófagos, como vectores para la producción de toxinas en las Secciones 21.10 y 21.22.

Diagnóstico, tratamiento y prevención

Existen diferentes ensayos disponibles para detectar niveles peligrosos de *S. aureus* en los alimentos. Están basados en la detección de la enterotoxina (detección mediante ELISA; *véase* Sección 24.11) o la exonucleasa de *Staphylococcus aureus* (una enzima que degrada el DNA). Sin embargo estas pruebas rápidas son cualitativas, confirmando sólo la presencia o ausencia de *S. aureus* entre los límites de detección de la prueba. Para obtener datos cuantitativos y determinar la extensión de la contaminación bacteriana, se requieren muestreos en placa. Para el muestreo de estafilococos se usa un medio con alto contenido en sal (tanto cloruro sódico como cloruro de litio a una concentración final del 7,5%). De los organismos presentes en los alimentos, los estafilococos son los únicos que toleran esta concentración de sal.

La intoxicación alimentaria por *S. aureus* puede ser severa pero es autolimitada, habitualmente se resuelve en 48 horas. Los casos severos pueden requerir tratamiento para la deshidratación. El tratamiento con antibióticos no es efectivo ya que la enfermedad es causada por una toxina previamente formada y no por una infección activa.

La intoxicación alimentaria por estafilococos puede ser prevenida mediante cuidadosas medidas sanitarias y de higiene, tanto en la producción y en la preparación como en el almacenamiento de los alimentos, que debe ser a bajas temperaturas para inhibir el crecimiento bacteriano. Los alimentos susceptibles de la colonización por *S. aureus* que hayan sido mantenidos varias horas a temperaturas superiores a 4°C (temperatura de refrigeración) deben ser descartados del consumo.

✓ 29.4 Revisión de conceptos

La intoxicación alimentaria por estafilococos resulta de la ingestión de la enterotoxina A, un superantígeno producido por *S. aureus* cuando crece sobre los alimentos. En muchos casos, *S. aureus* no puede cultivarse a partir de los alimentos contaminados.

- ✓ Explique los síntomas de la intoxicación por estafilococos y la acción de la endotoxina A
- ✓ ¿Pueden los antibióticos actuar sobre la aparición o la intensidad de la intoxicación estafilocócica? Explique por qué.

29.5 Intoxicación alimentaria por clostridios

Tanto *Clostridium perfringens* como *Clostridium botulinum* causan serias intoxicaciones alimentarias. Los miembros del género *Clostridium* son bacterias anaeróbicas y esporuladas. Los procesos de envasado y cocinado eliminan los organismos vivos pero no tienen efectos sobre las esporas. Bajo condiciones anaeróbicas apropiadas, las esporas germinan y producen la toxina.

Intoxicación alimentaria por *Clostridium perfringens*

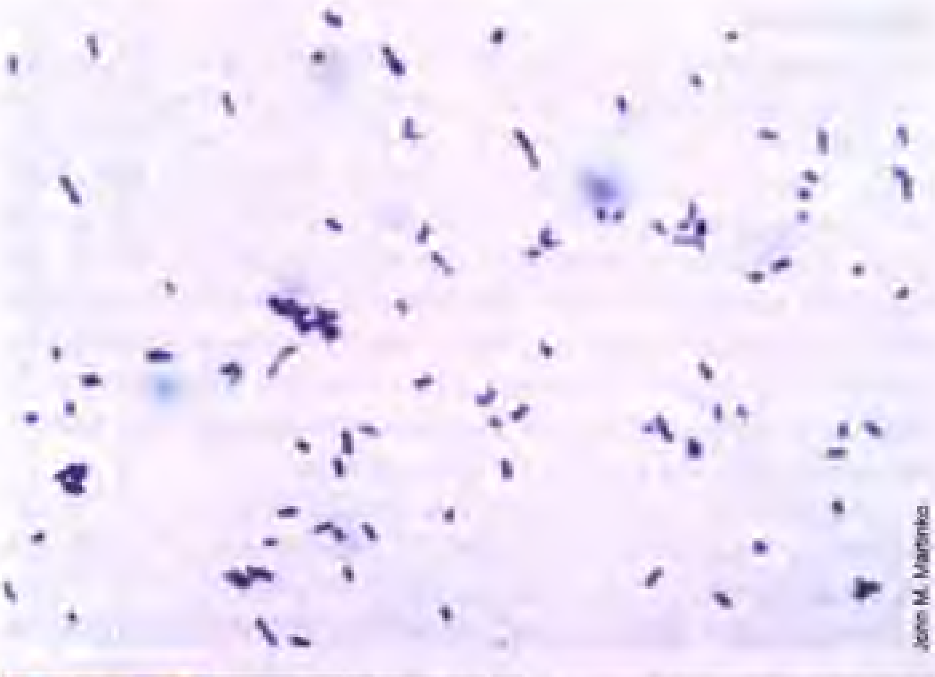


Figura 29.2 Tinción Gram de *Clostridium perfringens*. Los bacilos individuales Gram positivos miden 1 µm de diámetro.

John M. Martinko

Clostridium perfringens es una bacteria alargada, anaeróbica, Gram positiva, formadora de esporas, que se encuentra comúnmente en el suelo (Figura 29.2). También vive en bajo número en el tracto intestinal de muchos animales y, por tanto, se encuentra en las aguas residuales (*véase* Sección 12.21). *C. perfringens* es la causa más importante de intoxicación alimentaria en los Estados Unidos, con un número estimado de casos anual de 248 000 (Tabla 29.5).

La enfermedad se produce como consecuencia de la ingestión de una dosis elevada de *C. perfringens* ($>10^8$ células) en alimentos cocinados o sin cocinar, especialmente carnes, aves y pescado. Grandes cantidades de *C. perfringens* pueden crecer en platos de carne que ha sido cocinada con el animal entero (la penetración del calor en estas situaciones es a menudo lenta e insuficiente) y después mantenidas a 20-40°C durante cortos periodos de tiempo. La esporas de *C. perfringens* germinan en condiciones anaeróbicas, tales como de envases cerrados, y crecen rápidamente en la carne. No obstante la toxina no está aún presente.

Después del consumo de alimentos contaminados las células vivas de *C. perfringens* esporulan dentro del intestino, determinando la producción de la enterotoxina (*véase* Tabla 21.4). La enterotoxina altera la permeabilidad del epitelio intestinal produciendo diarrea y calambres intestinales, habitualmente sin fiebre ni vómitos. La aparición de los síntomas de intoxicación alimentaria por perfringens aparece entre 7 y 15 horas después de la ingesta del alimento contaminado y habitualmente se resuelve en 24h; los casos fatales son raros.

Diagnóstico, tratamiento y prevención

El diagnóstico de la intoxicación alimentaria por *C. perfringens* se hace por aislamiento del microorganismo a partir del intestino o, mejor aún, por ensayos de ELISA para detectar la toxina en las heces (*véase* Sección 24.11). Debido a que la intoxicación por *C. perfringens* es autolimitada, el tratamiento no es necesario, aunque hay antitoxinas disponibles (*véase* Sección 22.11). La prevención de la intoxicación alimentaria por *C. perfringens* requiere medidas para evitar la contaminación de alimentos crudos o cocinados, y control sobre el cocinado y el envasado para asegurarse una apropiada exposición al calor de todos los alimentos.

Botulismo

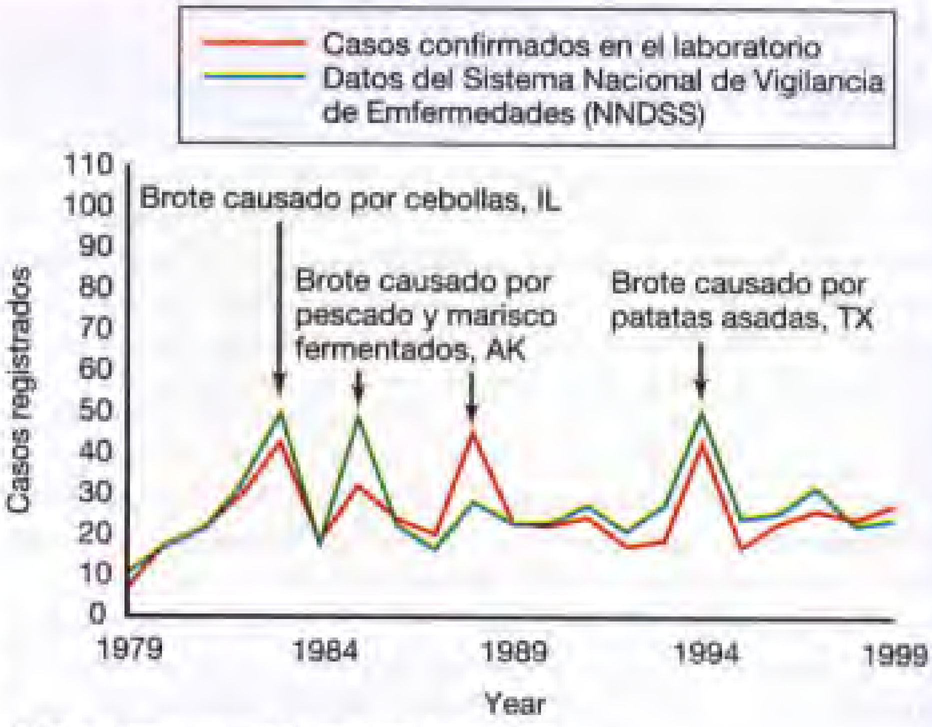
El **botulismo** es una intoxicación alimentaria severa; a menudo es fatal y ocurre por la consumición de alimentos que contienen la exotoxina producido por las bacterias anaeróbicas, Gram positivas, de *Clostridium botulinum*. Esta bacteria normalmente habita en el suelo o en el agua, pero sus esporas pueden contaminar alimentos crudos antes de ser cortados o matados. Si los alimentos son procesados de manera apropiada la esporas de *C. botulinum* son eliminadas, pero si hay esporas viables, éstas pueden iniciar el crecimiento y la producción de la toxina. Incluso en bajo número la neurotoxina puede ser muy tóxica.

Explicamos la naturaleza y la acción de la toxina botulínica en la Sección 21.10 (Figura 21.19). La toxina botulínica es una neurotoxina que causa parálisis flácida, afectando a los nervios autónomos que controlan funciones del cuerpo como la respiración y el latido del corazón. Se conocen al menos siete tipos de toxina botulínica. Las toxinas son destruidas por alta temperatura (80°C durante 10 minutos), y por tanto mediante el cocinado de la comida, incluso si esta está contaminada con la toxina, puede ser inocua.

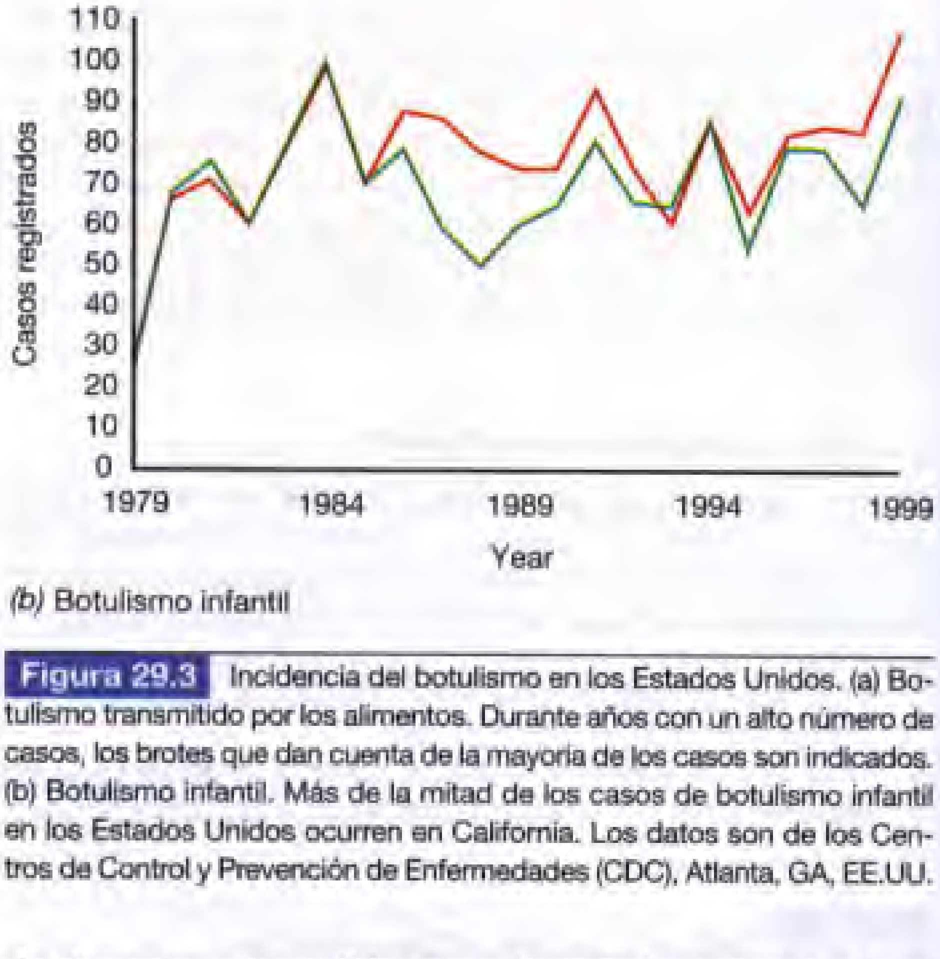
La mayoría de los casos de botulismo resultan de la ingesta de alimentos que no son cocinados después de ser procesados (Figura 29.3*a*). Por ejemplo, vegetales envasados domésticamente no ácidos (maíz, legumbres) son usados frecuentemente sin ser cocinados cuando se usan en ensaladas frías. Similarmente, pescado fresco y ahumado, empaquetados en plástico al vacío, son ingeridos habitualmente sin ser cocinados. Bajo estas condiciones, las esporas de *C. botulinum* pueden germinar y las células resultantes producen la toxina. Si estos alimentos son consumidos, incluso ingiriendo una pequeña cantidad, puede derivarse en una intoxicación muy peligrosa.

El botulismo infantil ocurre cuando las esporas de *C. botulinum* son ingeridas, a menudo a partir de miel cruda (Figura 29.3*b*). Si la biota normal del niño no se encuentra bien desarrollada o si el niño se encuentra bajo terapia con antibióticos, las esporas pueden germinar y las células de *C. botulinum* pueden crecer y producir la toxina. La mayoría de los casos de botulismo infantil ocurren entre la primera semana de vida y los dos meses de edad; el botulismo infantil es raro en niños de más de seis meses cuando la biota intestinal se encuentra desarrollada (*véase* Sección 21.4).

Todas las formas de botulismo son raras e inusuales; menos de 150 casos ocurren cada año en los Estados Unidos, pero más del 25% son fatales. La muerte ocurre por parálisis respiratoria y parada cardiaca debido a la acción paralizante de la neurotoxina botulínica (*véase* Sección 21.10).



(a) Botulismo causado por los alimentos



(b) Botulismo infantil

Figura 29.3 Incidencia del botulismo en los Estados Unidos. (a) Botulismo transmitido por los alimentos. Durante años con un alto número de casos, los brotes que dan cuenta de la mayoría de los casos son indicados. (b) Botulismo infantil. Más de la mitad de los casos de botulismo infantil en los Estados Unidos ocurren en California. Los datos son de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), Atlanta, GA, EE.UU.

Diagnóstico, tratamiento y prevención

El diagnóstico se realiza mediante la identificación de la toxina en el suero del paciente, o la toxina o células de *C. botulinum* en alimentos sospechosos. Las pruebas de laboratorio son complementadas con las clínicas incluyendo los signos neurológicos de parálisis localizadas (vista y palabra alteradas) que aparecen de 18 a 24 h después de la ingesta de la comida contaminada. El tratamiento incluye la administración de una antitoxina (*véase* Sección 22.11) y la ventilación mecánica. La prevención requiere el mantenimiento de cuidadosos controles sobre el envasado, conservación y calentamiento de alimentos susceptibles para destruir las esporas, o bien hervido durante 20 minutos para destruir las toxinas.

En el botulismo infantil, *C. botulinum* y la toxina se encuentran frecuentemente en la heces. El botulismo infantil es normalmente autolimitado y la mayoría de los pacientes se recuperan tan sólo con terapia reconstituyente, como es la respiración asistida. Muertes ocasionales pueden tener lugar como consecuencia del fallo respiratorio. La miel puede ser una fuente de *C. botulinum*, por ello se desaconseja la administración de miel a niños de menos de 2 años.

✓ 29.5 Revisión de conceptos

Las intoxicaciones alimentarias por *Clostridium* se producen por la ingestión de las toxinas producidas por el crecimiento microbiano en los alimentos, o por el crecimiento del microorganismo y la producción de la toxina dentro del cuerpo. La intoxicación alimentaria por *C. perfringens* es más común y normalmente es una enfermedad gastrointestinal autolimitada. El botulismo es más rara pero muy seria enfermedad, con alta mortalidad.

- ✓ Describa los eventos que determinan la intoxicación alimentaria por *C. perfringens*. ¿Cuáles son los síntomas de la intoxicación?
- ✓ Describa los eventos que determinan el botulismo. ¿Cuáles son los síntomas de la intoxicación?

29.6 Salmonelosis

Aunque a veces se la conoce como intoxicación alimentaria, la **salmonelosis** es una enfermedad gastrointestinal debida a una infección de *Salmonella* transmitida por los alimentos. Los síntomas aparecen después de la colonización del epitelio intestinal por el patógeno.

Biología y epidemiología

Salmonella ssp. son bacterias Gram negativas aeróbicas facultativas relacionadas con *Escherichia coli*, *Shigella* ssp. y otras bacterias entéricas (*véase* Sección 12.11). *Salmonella* normalmente habita en el intestino de los animales y por tanto también en las aguas residuales. Virtualmente, todas las *Salmonella* son patógenas para los humanos: una, *S. typhi*, produce una grave enfermedad conocida como fiebre tifoidea que es, afortunadamente, rara en los Estados Unidos, con la mayoría de los 500 casos importados de otros países. Sin embargo otras especies de *Salmonella* producen gastroenteritis transmitidas por los alimentos. En conjunto, más de 1400 serotipos son conocidos y clasificados como patógenos dentro de las especies de *Salmonella*. *S. typhimurium* es la causa más común de salmonelosis en humanos. La incidencia de casos registrados de salmonelosis se ha mantenido muy estable durante la última década, con alrededor de 45 000 casos documentados al año (Figura 29.4). Sin embargo, se registran menos del 4% de los casos totales de salmonelosis, y por tanto las estimaciones se elevan hasta 1 300 000 casos de salmonelosis cada año (Tabla 29.5).

Las últimas fuentes de salmonelas transmitidas por los alimentos son el tracto intestinal del hombre y otros animales de sangre caliente. El hombre (o animal) puede ingerir alimentos contaminados (con heces) por parte de los manipuladores (contaminación cruzada). Animales productores de alimento como los pollos y el ganado pueden también ser portadores de *Salmonella* patógenas para humanos, que pueden, pasar a los alimentos frescos tales como huevos, carne y productos lácteos. Las infecciones de alimentos por *Salmonella* también aparecen frecuentemente en productos como natillas, pasteles con crema, merengues, y productos que incluyen huevo sin cocinar. Otros alimentos comúnmente implicados en los brotes de salmonelosis son las carnes y los productos cárnicos como pasteles de carne, salchichas curadas pero no cocinadas, las aves, la leche y los productos lácteos.

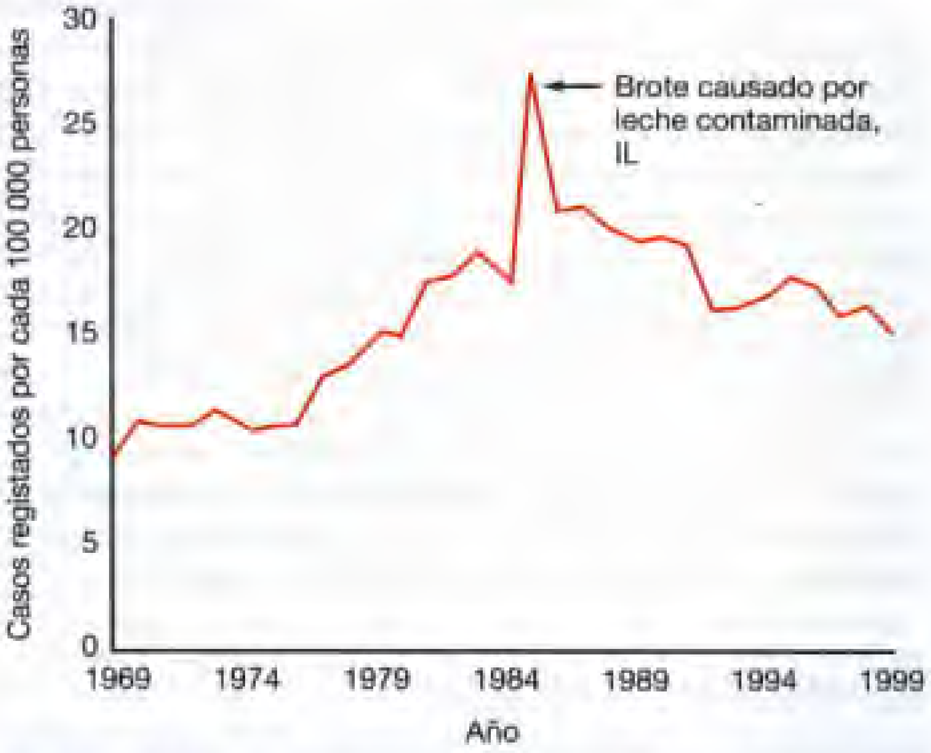


Figura 29.4 La incidencia de casos registrados de salmonelosis en los Estados Unidos. El número total de casos registrados es entre 40 000 y 45 000 por año. Estudios epidemiológicos sugieren que sólo alrededor del 3% de los casos de salmonelosis son propiamente registrados. Los datos son de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades, Atlanta, GA, EE.UU.

Patogénesis

La salmonelosis más común es la enterocolitis producida por *Salmonella*. La ingestión de alimentos conteniendo 10^5-10^8 *Salmonella* viables deriva en la colonización del intestino delgado y grueso. La aparición de la enfermedad ocurre 8 a 48 h después de la ingesta. Los síntomas incluyen un repentino dolor de cabeza, escalofríos, vómitos y diarrea, seguido de fiebre durante varios días. Esta enfermedad normalmente desaparece sin intervención en 2 o 3 días. Sin embargo, incluso después de la recuperación, los pacientes tienen *Salmonella* en las heces durante varias semanas. Algunos pacientes se recuperan y se transforman en asintomáticos, pero portan microorganismos durante meses o incluso años, resultando en portadores crónicos (*véase* el recuadro, «El trágico caso de María Tifoidea», Capítulo 25).

La salmonelosis también puede producir septicemia, una infección de la sangre, fiebre entérica o fiebre tifoidea, una enfermedad caracterizada por la infección sistémica y fiebre alta durante varias semanas. La mortalidad se acerca al 15% en casos no tratados de fiebre tifoidea.

Diagnóstico, tratamiento y prevención

El diagnóstico se hace mediante la observación clínica de los síntomas, la historia del consumo reciente de alimentos y por cultivo del microorganismo a partir de las heces. Varios medios selectivos están disponibles (*véase* Sección 24.2), y pruebas para detectar la presencia de *Salmonella* se realizan comúnmente en productos alimenticios de origen animal tales como carne cruda, aves, huevos y leche en polvo, ya que éstas son la fuentes de contaminación por *Salmonella*.

El tratamiento para la enterocolitis no es necesario, el tratamiento con antibióticos no reduce el curso de la enfermedad o elimina el estado de portador. El tratamiento con antibióticos reduce significativamente la gravedad, y la duración de la septicemia y la fiebre tifoidea. La mortalidad debida a la fiebre tifoidea puede ser reducida hasta menos del 1% con una terapia antibiótica adecuada.

Alimentos cocinados a 70°C durante al menos 10 minutos son considerados aptos si son consumidos inmediatamente, o si se mantienen a 50°C o almacenados a 10°C o menos. Los alimentos cocinados o envasados pueden contaminarse por la acción de un manipulador contaminado si son mantenidos por largos periodos de tiempo sin calentamiento o refrigeración. Las infecciones por *Salmonella* son más frecuentes en verano que en invierno, probablemente debido a que el ambiente templado es más favorable para el crecimiento de los microorganismos sobre los alimentos (Figura 29.4).

Aunque los esfuerzos y las leyes locales varían, debido a la larga duración del estado de portador, los individuos infectados son a menudo desplazados de los puestos de manipulación de alimentos hasta que sus heces son negativas para *Salmonella* en tres cultivos sucesivos.

✓ 29.6 Revisión de conceptos

La salmonelosis, una infección extremadamente común transmitida por los alimentos, resulta de la infección mediante la ingestión de *Salmonella* ssp. *Salmonella* puede entrar en los alimentos a través de los animales productores o de su manipulación.

- ✓ Describa los tres tipos de infecciones alimentarias por *Salmonella*. ¿Cuál es la más común?
- ✓ ¿Cómo puede contenerse la contaminación de *Salmonella* en los animales productores de alimentos?

29.7 Cepas patógenas de *Escherichia coli*

Diferentes cepas de *Escherichia coli* son patógenas potenciales transmitidas por los alimentos. Todas las cepas patógenas actúan primero en el intestino y muchas se caracterizan por su capacidad para producir potentes enterotoxinas (*véase* Sección 21.11).

Biología, epidemiología y patogénesis

Escherichia coli es un habitante comensal en el intestino de los animales. Son bacterias pequeñas, alargadas, Gram negativas y clasificadas dentro de las bacterias entéricas (*véase* Sección 12.11). Existe alrededor de 200 cepas patógenas conocidas de *E. coli* que pueden causar enfermedades diarreicas y del tracto urinario, que pueden poner en peligro la vida del paciente. Las cepas patógenas se dividen en varias categorías, basándose primero en la toxina que producen y en la enfermedad que causan.

La cepa enterohemorrágica de *E. coli* (EHEC) produce *verotoxina*, una enterotoxina similar a la producida por *Shigella dysenteriae*, la toxina Shiga (*véase* Tabla 21.4). Después de la ingestión de comida o agua que contenga una cepa particular de EHEC, *E. coli* O157:H7, el organismo crece en el intestino delgado produciendo la verotoxina. La verotoxina produce diarrea hemorrágica y fallo renal. *E. coli* O157:H7 causa al menos 60 000 infecciones y 50 muertes cada año como enfermedad transmitida por los alimentos (Tabla 29.5) y es la causa más importante de fallo renal en niños. La causa más común de esta infección es la ingestión de carne sin cocinar o poco cocinada, particularmente carne picada procesada en grandes cantidades. En distintos grandes brotes en que se vio involucrada la cepa O157:H7 de *E. coli* infectando carne picada de ternera, la fuente de contaminación fueron los centros regionales de distribución que produjeron el esparcimiento de la enfermedad en varios estados. En otros brotes se vio involucrada carne de ternera procesada, curada, pero no cocinada en forma de salchichas listas para consumirse. La mayor fuente de contaminación parece ser la ternera, y la cepa de *E. coli* se origina de las carcasas de los animales sacrificados. Dado que *E. coli* O157:H7 crece en el intestino y se encuentra en el material fecal, es también una fuente potencial de enfermedad transmitida por el agua. Ha habido varios casos serios de infección por esta cepa en áreas de baño públicas infectadas con restos fecales.

La diarrea a menudo se produce en niños en países en desarrollo. También ocurre como «diarrea del viajero», una muy común infección entérica que causa diarrea en viajeros, en países en desarrollo. El principal agente causal es la cepa enterotoxigénica de *E. coli* (ETEC). Las cepas ETEC producen dos enterotoxinas termolábiles que determinan la diarrea. En estudios realizados en ciudadanos de los Estados Unidos que viajaban por México, la proporción de infectados por estas cepas supera el 50%. Los principales vehículos son alimentos como los vegetales frescos (lechuga en ensalada) y el agua. La proporción tan alta de infección en viajeros es debido a la contaminación de la distribución pública de agua. La población local es habitualmente resistente a la infección, indudablemente debido a que han convivido con el agente durante largos periodos de tiempo. Anticuerpos de secreción (Sección 22.9) presentes en el intestino pueden prevenir eficientemente la colonización del patógeno en los residentes locales, pero el microorganismo puede colonizar el intestino de personal no inmunizado causando la enfermedad.

E. coli enteropatógenas (EPEC) causa diarreas en niños y bebes, pero no produce enfermedades invasivas o toxinas. Cepas de *E. coli* enteroinvasivas (EIEC) causan enfermedades invasivas en el colon, produciendo diarrea con sangre. El patógeno es capturado por los fagocitos, donde escapa a la lisis en los fagolisosomas (Sección 22.2), crece en le citoplasma y desde allí se va a otras células. Esta enfermedad invasiva causa diarrea y es muy común en los países en desarrollo.

Diagnóstico, tratamiento y prevención

El patrón general establecido para el diagnóstico, tratamiento y prevención de la infección por *E. coli* O157:H7 refleja los procedimientos actuales para el resto de las cepas patógenas. El diagnóstico de la infección por *E. coli* O157:H7 necesita del cultivo a partir de heces y de la identificación de los antígenos O y H, y de las toxinas, mediante serología (*véanse* Secciones 4.9 y 24.7). El tipado de las cepas también se hace usando métodos moleculares tales como polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) y electroforesis de campo pulsado (*véase* el recuadro «Huella dactilar del DNA», Capítulo 31). La infección por *E. coli* O157:H7 es una enfermedad infecciosa registrada nacionalmente (*véase* Tabla 25.3).

El tratamiento de todas la infecciones por *E. coli* implica terapia de soporte y, en casos severos, fármacos antimicrobianos para acortar o eliminar la infección.

La forma más efectiva de prevenir la infección con la cepa enteropatógena de *E. coli* O157:H7 es estar seguro de que la carne está bien cocinada, lo que significa que debe aparecer gris o marrón y los jugos deben se claros. Como discutimos anteriormente (Sección 29.2), los Estados Unidos han aprobado la irradiación de la carne picada como método aceptable para eliminar o reducir la infección bacteriana de los alimentos, principalmente debido a la implicación de esta cepa de *E. coli* en varias epidémias. La irradiación penetrante es considerada el único medio efectivo para asegurarse la descontaminación antes del picado de la carne, ya que el proceso de picado puede extender los patógenos por toda la carne, no sólo por la superficie. En general un manejo apropiado de los alimentos, la purificación del agua y los hábitos higiénicos pueden prevenir las infecciones por cepas patógenas de *E. coli*. La diarrea del viajero puede ser prevenida evitándose las fuentes locales de agua y los alimentos frescos.

✓ 29.7 Revisión de conceptos

E. coli enteropatógenas puede producir seria infecciones. Precauciones específicas, tales como irradiación de la carne de ternera picada, ayudan en el control de estos patógenos.

✓ Describa la patología de la infección alimentaria por las cepas enteropatógenas de *E. coli*. ¿Cuáles son los síntomas?

✓ ¿Cómo se puede prevenir la contaminación de los productos animales por *E. coli?*

29.8 *Campylobacter*

Campylobacter ssp. produce la infección bacteriana transmitida por los alimentos de mayor incidencia en los Estados Unidos.

Biología y epidemiología

Las especies de *Campylobacter* son bacterias Gram negativas móviles, con forma alargada y curvada, que crecen en ambientes con reducida tensión de oxígeno, es decir, son microaerófilos (*véase* Sección 12.14). Se conocen varias especies patógenas como *Campylobacter jejuni*, *C. coli* y *C. fetus*. *C.jejuni* y *C. coli* dan cuenta de casi 2 millones anuales de casos de diarrea (Tabla 29.5). *Campylobacter fetus* es económicamente importante porque es la mayor causa de esterilidad y abortos espontáneos en ganado vacuno y ovino.

Campylobacter se transmite a los humanos a través de alimentos contaminados, más frecuentemente aves, cerdo, almejas crudas, otros bivalvos, o en aguas superficiales no sujetas a cloración. *C. jejuni* es un residente normal del intestino de las aves, y por ello virtualmente todos los pollos y pavos lo portan. Por el contrario, la ternera es raramente un vehículo transmisor. Las especies de *Campylobacter* también infectan a animales domésticos como perros, causando una forma ligera de diarrea que también se observa en humanos. Los casos de infección por *Campylobacter* en niños es frecuente que sean transmitidos desde animales domésticos infectados, especialmente perros.

Patogénesis

Después de la ingestión de comida contaminada con al menos 10^4 células de *Campylobacter*, el organismo se multiplica en el intestino delgado, invade el epitelio y causa inflamación que determina la enfermedad. Los síntomas de la infección por *Campylobacter* incluyen fiebre elevada (habitualmente más de 40°C), dolor de cabeza, malestar, náuseas, calambres intestinales y una profusa diarrea, frecuentemente con sangre. La enfermedad dura alrededor de una semana y la recuperación es completa y espontánea.

Diagnóstico, tratamiento y prevención

El diagnóstico requiere el aislamiento del organismo a partir de muestras de heces e identificación mediante pruebas de crecimiento o ensayos inmunológicos. Debido a la frecuencia con que las infecciones por *C. jejuni* aparecen en niños, se ha desarrollado una variedad de medios selectivos y métodos inmunológicos muy específicos para la identificación positiva de este organismo. El tratamiento de las infecciones con eritromicina no acorta la diarrea aguda pero puede acortar el tiempo que los pacientes tienen a *Campylobacter* en sus heces. La eliminación de la infección por *Campylobacter* requiere higiene personal, apropiado lavado de aves sin cocinar (y cualquier utensilio que haya estado en contacto con estas aves) y a través del cocinado de la carne se elimina la posibilidad de infección.

✓ 29.8 Revisión de conceptos

La infección por *Campylobacter* es con mucho la infección de transmisión por alimentos con mayor incidencia. Aunque autolimitada, esta enfermedad afecta a casi 2 millones de personas al año.

✓ Describa la patología de la infección de *Campylobacter* transmitida por los alimentos. ¿Cuáles son los síntomas?

✓ ¿Cómo se puede controlar la infección por *Campylobacter* de los productos de los animales?

29.9 Listeriosis

Listeria monocytogenes está emergiendo como un importante patógeno transmitido por los alimentos. *L. monocytogenes* produce la *listeriosis*, una infección alimentaria gastrointestinal que puede derivar en bacteremia y meningitis.

Biología y epidemiología

L. monocytogenes es una bacteria ácido-tolerante, tolerante a sales, criotolerante y anaeróbica facultativa. Es un bacilo Gram positivo, pequeño, alargado y no forma esporas (*véase* Sección 12.19) (Figura 29.5). Se encuentra muy extendida en el suelo y en el agua, y prácticamente en todos los alimentos frescos; entonces los alimentos frescos se pueden contaminar en cualquier momento tanto del crecimiento como del procesamiento. Métodos eficaces para el control de otros microorganismos como la refrigeración, no son efectivos en este caso dado su carácter criotolerante. Así pues,

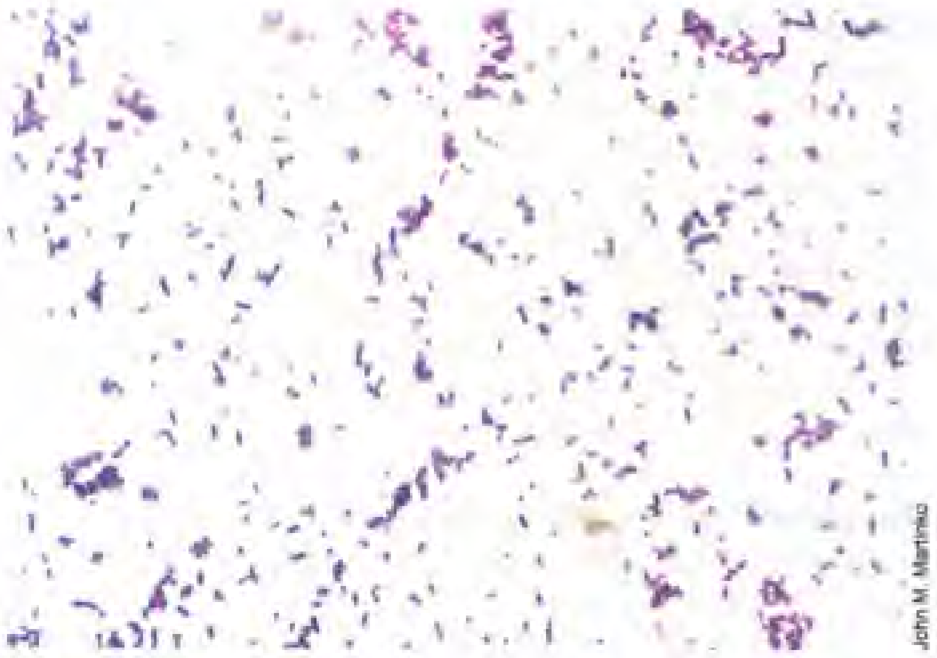


Figura 29.5 Tinción Gram de *Listeria monocytogenes*. Los pequeños bacilos Gram positivos miden 0,5 μm de diámetro.

carne, productos lácteos y productos frescos pueden ser contaminados por este patógeno. Brotes de listerioris aparecen a partir de fuentes comunes tales como alimentos procesados listos para consumir (productos cárnicos/lácteos sin pasteurizar) conservados durante largo tiempo en los refrigeradores (4°C).

Patogénesis

L. monocytogenes es un patógeno intracelular, entra en el cuerpo a través del tracto gastrointestinal con la ingestión de alimentos contaminados. El patógeno es fagocitado por fagocitos, crece en el interior de éstos, lisa al fagocito, y se extiende por las células de los alrededores. La inmunidad frente a *L. monocytogenes* es principalmnete mediada por células de tipo TH1 (*véase* Sección 22.7). Los individuos que presentan una inmunidad celular disminuida, incluyendo ancianos, recién nacidos, pacientes inmunosuprimidos con fármacos (esteroides) o aquéllos que tienen enfermedades inmunosupresoras como el SIDA tienen una incrementada susceptibilidad a la listeriosis (*véase* Sección 26.14).

Aunque la exposición a *L. monocytogenes* es indudablemente muy común, la listeriosis aguda es muy rara. La enfermedad aguda se caracteriza por septicemia y meningitis y tiene una tasa de mortalidad de alrededor del 20%. Hay sólo unos 2500 casos de listeriosis aguda al año, pero unos 500 muertos. Prácticamente todos requieren hospitalización.

Diagnóstico, tratamiento y prevención

El diagnóstico de la listeriosis está acompañado del cultivo de *L. monocytogenes* a partir de la sangre o del fluido raquídeo. *L. monocytogenes* puede ser identificada en los alimentos por cultivo directo o por una variedad de métodos moleculares como el ribotipado (*véase* Sección 11.9) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (*véase* Sección 10.17, Sección 24.13 y Tabla 24.9). El tratamiento antibiótico con trimetoprim-sulfametoxazol es efectivo.

Las medidas de prevención incluyen la limitación de la contaminación de los sitios de procesamiento. Dado que *L. monocytogenes* es sensible al calor y a la radiación, los alimentos crudos y los utensilios que se emplean deben ser apropiadamente descontaminados. Sin embargo, el riesgo de contaminación no puede ser eliminado debido a la amplia distribución del patógeno. Individuos inmunocomprometidos deben evitar productos lácteos no pasteurizados y poner especial atención en las fechas de caducidad cuando se ingieren productos procesados listos para su consumo.

✓ 29.9 Revisión de conceptos

L. monocytogenes es ubicua en el ambiente. En individuos normales, *Listeria* no produce infecciones; sin embargo en individuos inmunocomprometidos puede producir serias enfermedades e incluso la muerte.

- ✓ Describa la patología de la infección alimentaria por *L. monocytogenes*. ¿Cuáles son los síntomas en individuos normales?
- ✓ ¿Por qué los individuos inmunocomprometidos son extremadamente sensibles a las infecciones por *Listeria*?

29.10 Otras enfermedades infecciosas transmitidas por alimentos

Un buen número de otros microorganismos y agentes infecciosos determinan las enfermedades transmitidas por los alimentos.

Bacterias

En la Tabla 29.5 se enumeran otras bacterias que causan enfermedades transmitidas por los alimentos en humanos. *Yersinia enterocolitica* se encuentra comúnmente en los intestinos de los animales domésticos causando infecciones debidas a la contaminación de carne y productos lácteos. *Y. enterocolitica* causa la fiebre entérica, una severa infección que compromete incluso la vida de los pacientes. *Bacillus cereus* produce una enterotoxina que genera diarrea y vómitos. *B. cereus* crece en alimentos con gran contenido en carbohidratos como el arroz. Las esporas de esta bacteria Gram positiva germinan y mientras el organismo crece sobre los alimentos mantenido a temperatura ambiente se produce la toxina. El recalentamiento puede eliminar a la bacteria pero la toxina se mantiene activa. *Shigella* ssp. causa alrededor de 100 000 casos de gastroenteritis invasiva aguda cada año. Varios miembros del género *Vibrio* causan intoxicaciones alimentarias después del consumo de bivalvos contaminados.

Virus

La mayor parte de los casos anuales de infecciones transmitidas por los alimentos se piensa que son debidas a los virus. En general estas infecciones consisten en una gastroenteritis caracterizada por diarrea, a menudo acompañada de vómito y náusea. La recuperación es espontánea y rápida, habitualmente en las 24 a 28 horas siguientes («gripe de las 24 h»). Los virus del tipo Norwalk (*véanse* Tabla 25.5 y Sección 28.8) son los responsables de la mayoría de las infecciones de este tipo en los Estados Unidos (Tabla 29.5), dando cuenta de más de 9 millones de los 13 millones de infecciones transmitidas por alimentos que ocurren cada año. Rotavirus, astrovirus y el virus de la hepatitis A (*véase* Sección 26.11) colectivamente causan 100 000 casos de infecciones al año. Estos virus habitan en el intestino y son frecuentemente transmitidos por la comida o el agua con materiales fecales. Como en muchas infecciones transmitidas por alimentos, la apropiada manipulación, la higiene de los manipuladores y unas fuentes de agua adecuadas para preparar los alimentos frescos son esenciales en la prevención de la infección.

Parásitos

Importantes enfermedades transmitidas por los alimentos y determinadas por parásitos son enumeradas en la Tabla 29.5. Parásitos incluyendo *Giardia lamblia, Cryptospordium parvum* y *Cyclospora cayetanensis* pueden ser transmitidos a través de los alimentos, presumiblemente conteniendo materia fecal en aguas no tratadas usadas para lavar o regar cultivos. Alimentos frescos tales como frutas están a menudo implicados como fuente de estos parásitos. Ya discutimos la giardiasis y la criptosporidiasis en el capítulo anterior (Sección 28.7). La criptoporiasis es una gastroenteritis aguda que representa una importante enfermedad emergente. La mayoría de los casos parecen ser el resultado del consumo de productos frescos importados.

Toxoplasma gondii es un parásito transmitido a través de las heces de los gatos, que puede también encontrarse en carne cruda sin cocinar. En la mayoría de los individuos, la infección causa una ligera y autolimitada gastroenteritis. Sin embargo, la infección prenatal puede determinar una variedad de complicaciones incluyendo ceguera del recién nacido. Individuos inmunocomprometidos también exhiben signos de toxoplamosis aguda.

Priones

Los *priones* son proteínas, presumiblemente del propio huésped, que adoptan nuevas conformaciones, inhibiendo la función de la proteína normal y causando alteraciones en el tejido neuronal. La variedad humana de la enfermedad transmitida por alimentos y determinada por los priones es conocida como «variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob» (vCJD). vCJD es un lento y degenerativo desorden del sistema nervioso central que ha afectado a varios cientos de personas en el Reino Unido y otro países europeos (Sección 9.13). La enfermedad parece transmitirse por la ingestión de productos cárnicos de vacas aquejadas de encefalitis espongiforme bovina (BSE), una enfermedad causada por priones y comúnmente conocida como enfermedad «de las vacas locas». Aunque el proceso de replicación no está totalmente aclarado, los priones BSE consumidos de la carne de animales afectados de alguna manera determinan cambios estructurales y funcionales en proteínas humanas relacionadas que adquieren la conformación alterada ocasionando su disfunción y la enfermedad. BSE no ha sido detectada en vacas en los Estados Unidos al igual que tampoco vCJD en humanos. En Europa, todas las vacas que tenían o eran sospechosas de padecer BSE han sido destruidas. La prohibición de alimentar las vacas con alimentos de origen animal parece haber detenido la aparición de nuevos casos de BSE en Europa.

✓ 29.10 Revisión de conceptos

Más de 200 agentes infecciosos son responsables de las enfermedades transmitidas por los alimentos. Los virus son los responsables de la mayoría de los casos. Otras bacterias, parásitos y priones también pueden determinarlas.

- ✓ Identifique los virus más sospechosos de estar involucrados en la enfermedades transmitidas por los alimentos.
- ✓ ¿Cómo puede evitarse en Estados Unidos la contaminación con priones de los animales de producción?

Preguntas de repaso

1. Identifique y defina las tres categorías más importantes de alimentos con respecto a sus características perecederas.
2. Identifique los métodos más importantes usados para conservar los alimentos. Dé un ejemplo de cada caso.
3. Distinga entre infección e intoxicación debida a alimentos.
4. Describa la patogénesis de las intoxicaciones alimentarias por estafilococos. Sugiera métodos para su prevención.
5. Identifique los dos tipos principales de intoxicaciones alimentarias por clostridios. ¿Cuál es el más importante? ¿Cuál es más peligrosa?
6. ¿Cuáles son la posibles fuentes de *Salmonella* ssp. que producen infecciones alimentarias?
7. ¿Qué medidas se han tomado para controlar el crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 en la carne picada?
8. *Campylobacter* causa más infecciones alimentarias que cualquier bacteria. Identifique al menos una razón de este fenómeno.
9. Identifique las fuentes de las infecciones por *Listeria monocytogenes*. Identifique los individuos de mayor riesgo.
10. ¿Por qué los agentes víricos están tan asociados con las enfermedades de transmisión por alimentos?

Ejercicios prácticos

1. Identifique las condiciones óptimas de almacenamiento para productos alimenticios perecederos, semiperecederos y no perecederos. Considere factores económicos tales como el coste del almacenamiento y el valor del alimento almacenado.
2. Para un alimento de su elección, diseñe un método de almacenamiento que no sea la deshidratación ni la congelación.
3. La intoxicación alimentaria se produce por la ingestión de *Clostridium perfringens* seguida del crecimiento y la esporulación en el intestino del hospedador. La esporulación determina la producción de la toxina. ¿Es esta enfermedad una verdadera intoxicación alimentaria o puede ser clasificada como una infección alimentaria? Razone la respuesta.
4. La mayonesa, el aliño para ensaladas a base de huevo, se emplea comúnmente para preparar ensaladas de patata. Ensaladas de patata incorrectamente manipuladas son a menudo el origen de intoxicaciones alimentarias por estafilococos o salmonelas. Explique varios métodos por los que una ensalada de patata puede ser inoculada tanto con *Staphylococcus aureus* como con *Salmonella* ssp.
5. *Clostridium botulinum* requiere un ambiente anaeróbico para producir la toxina botulínica. Identifique los métodos de conservación de los alimentos que crean un ambiente apropiado para el crecimiento de este microorganismo. Inversamente, indique métodos de conservación que creen un ambiente oxigenado e inhiban el crecimiento de *Clostridium botulinum*.
6. ¿Por qué los antibióticos no son generalmente empleados en el tratamiento de las salmonelosis? Explique su respuesta basándose en el hábitat del organismo y la accesibilidad de los antibióticos. También considere la posible resistencia a los antibióticos.
7. Indique las precauciones necesarias para prevenir la infección con cepas enteropatógenas de *Escherichia coli*. Céntrese en la manipulación, cocinado y consumo de los alimentos.
8. Diseñe un plan para eliminar la contaminación de *Campylobacter* de una bandada de aves. Explique las ventajas de un ave sin *Campylobacter* y los problemas que puede generar su proyecto.
9. La listeriosis normalmente tiene lugar sólo cuando hay una disfunción en la inmunidad mediada por células del tipo TH1. Indique por qué. Diseñe una vacuna para la protección frente a esta enfermedad. ¿Puede su vacuna emplearse en la población susceptible a la listeriasis?
10. Indique las razones de la alta incidencia de las enfermedades alimentarias víricas. Diseñe un plan para eliminar los virus del tipo Norwalk de las fuentes de alimento.

En microbiología industrial, la producción con rendimiento económico sólo es posible si se realiza a gran escala. A fin de hacer un producto económicamente competitivo por fermentación microbiana, el medio de cultivo empleado debe ser barato y los recipientes de cultivo extremadamente grandes. Aquí se muestran grandes fermentadores al aire libre para cultivar levaduras, para la producción de alcohol en Japón. A diferencia de muchos productos biocatalíticos, como los antibióticos, el etanol es un producto químico que se vende en grandes cantidades a un precio relativamente bajo. Por tanto, el proceso microbiano debe ser tecnológicamente muy refinado y funcionar al máximo rendimiento a gran escala si se desea obtener un producto con la calidad necesaria para competir con éxito en el mercado.

30

MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL Y BIOCATÁLISIS

I MICROORGANISMOS INDUSTRIALES, PRODUCTOS Y FORMACIÓN DE PRODUCTOS 958

30.1 Microorganismos industriales y productos industriales 958

30.2 Crecimiento y formación del producto en biocatálisis 959

30.3 Características de las fermentaciones a gran escala 961

30.4 Escalado de la fermentación 963

II PRINCIPALES PRODUCTOS DE LA MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL 964

30.5 Antibióticos: aislamiento y caracterización 964

30.6 Producción industrial de penicilinas y tetraciclinas 967

30.7 Vitaminas y aminoácidos 969

30.8 Bioconversión microbiana 971

30.9 Enzimas 972

30.10 Vinagre 974

30.11 Ácido cítrico y otros compuestos orgánicos 975

30.12 Levadura como agente de fermentación y como suplemento alimenticio 976

30.13 Alcohol y bebidas alcohólicas 978

30.14 Las setas como fuente de alimento 983

Glosario

Aminoglicósidos un grupo de antibióticos tales como la estreptomicina, que contienen aminoazúcares unidos por enlaces glicosídicos

Antibióticos β-lactámicos un grupo de antibióticos tales como la penicilina, que contienen el anillo β-lactámico de cuatro átomos heterocíclico

Bebida destilada una bebida que contiene alcohol concentrado por destilación

Biocatálisis la utilización de microorganismos en una transformación química específica

Bioconversión la utilización de microorganismos para realizar una reacción química que es más cara o irrealizable no biológicamente

Cerveceo (brewing) elaboración de bebidas alcohólicas tales como la cerveza a partir de la fermentación de cereales malteados

Enzima inmovilizada una enzima unida a un soporte sólido sobre el que se pasa el sustrato y queda convertida en producto

Escalado o cambio de escala adaptación de un proceso industrial desde las condiciones de un pequeño laboratorio a las de una fermentación comercial a gran escala

Extremoenzima una enzima capaz de funcionar en presencia de una o varias condiciones físicas o químicas extremas, por ejemplo a altas temperaturas o bajo pH

Fermentación en un contexto industrial, cualquier proceso microbiano a gran escala tanto si se realiza aeróbica como anaeróbicamente

Fermentador el tanque en el que se realiza una fermentación industrial

Materias primas químicas productos químicos como el etanol que tienen un bajo valor monetario y se venden principalmente a granel

Metabolito primario un metabolito que se excreta durante la fase logarítmica de crecimiento

Metabolito secundario un metabolito que se excreta al final de la fase logarítmica de crecimiento y en la fase estacionaria de crecimiento

Penicilina biosintética producción de una forma particular de penicilina que aporta al organismo los precursores específicos de la cadena lateral

Penicilina semisintética una penicilina obtenida a partir de compuestos producidos por fermentación microbiana y síntesis química

Proteasa una enzima que degrada proteínas por hidrólisis

Tetraciclinas una clase de antibióticos que contienen el anillo de naftaceno de cuatro átomos

Tratamiento secundario en el tratamiento de aguas residuales, la descomposición tanto aeróbica como anóxica de las aguas residuales, después de retirar los objetos no degradables por tratamiento primario

I MICROORGANISMOS INDUSTRIALES, PRODUCTOS Y FORMACIÓN DE PRODUCTOS

La microbiología industrial es la disciplina que utiliza los microoganismos, cultivados a gran escala, para obtener productos con valor comercial o realizar importantes transformaciones químicas. La microbiología industrial se inició con los procesos de fermentación alcohólica, como los que se usan para producir cerveza y vino. Posteriormente, se desarrollaron procesos microbianos para la síntesis de productos farmacéuticos (como los antibióticos), aditivos alimentarios (como los aminoácidos), enzimas y productos químicos como el butanol y el ácido cítrico. Todos estos procesos microbiológicos industriales se basan en la potenciación de las reacciones metabólicas que los microorganismos ya eran capaces de realizar, con la finalidad —en la mayoría de los casos— de sobreexpresar el producto que interese. Pero ahora, además de la microbiología industrial tradicional, una nueva era ha comenzado, la de la *biotecnología microbiana*. En biotecnología, los métodos para la manipulación génica han dado lugar a nuevos productos microbianos; los microorganismos no producen la mayoría de ellos de forma natural (*véase* Capítulo 31).

El término *biocatálisis* se ha usado para describir las reacciones que realizan los microorganismos en microbiología industrial. En este capítulo expondremos algunas biocatálisis industriales, junto con algunos de los problemas que representan el cultivo de microorganismos a gran escala y las soluciones a dichos problemas que los microbiólogos industriales han dado, a lo largo de los años. Empezaremos con un revisión general de los microorganismos industriales y sus productos.

30.1 Microorganismos industriales y productos industriales

Los principales microorganismos usados en los procesos biocatalíticos son los hongos (levaduras y mohos) y algunos procariotas, particularmente miembros del género *Streptomyces*. En cierto modo, los microorganismos industriales son especialistas metabólicos capaces de ser manipulados en cultivos a gran escala para producir uno o más productos con un alto rendimiento. A fin de conseguir esta elevada especialización, a menudo las cepas de los microorganismos industriales sufren una manipulación genética por mutación o por recombinación, siempre con el objetivo de incrementar el *rendimiento* de un producto particular que una cepa determinada puede producir.

La principal fuente de todas las cepas de los microorganismos utilizados en los procesos biocatalíticos es la naturaleza. Sin embargo, las cepas industriales actuales ya no provienen de la condición «silvestre» que existía cuando se aisló la cepa por primera vez. Una vez que se han desarrollado microorganismos con valor en la industria, se conservan en los laboratorios de microbiología de las industrias y también en grandes colecciones nacionales de cultivos tipo, tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, *American Type Culture Colection*) en Estados Unidos, o la Colección Alemana de Cultivos Tipo, su correspondiente en Alemania (DSMZ, *Deuvtsche Sammlung von Mikroorganism un Zelkulturen*). En las colecciones, los cultivos de microorganismos están disponibles para fines docentes, de investigación e industriales. Cuando se patenta un nuevo proceso biocatalítico, una cepa que lleva a cabo dicho proceso debe depositarse en una de estas colecciones. No obstante, por diversas razo-

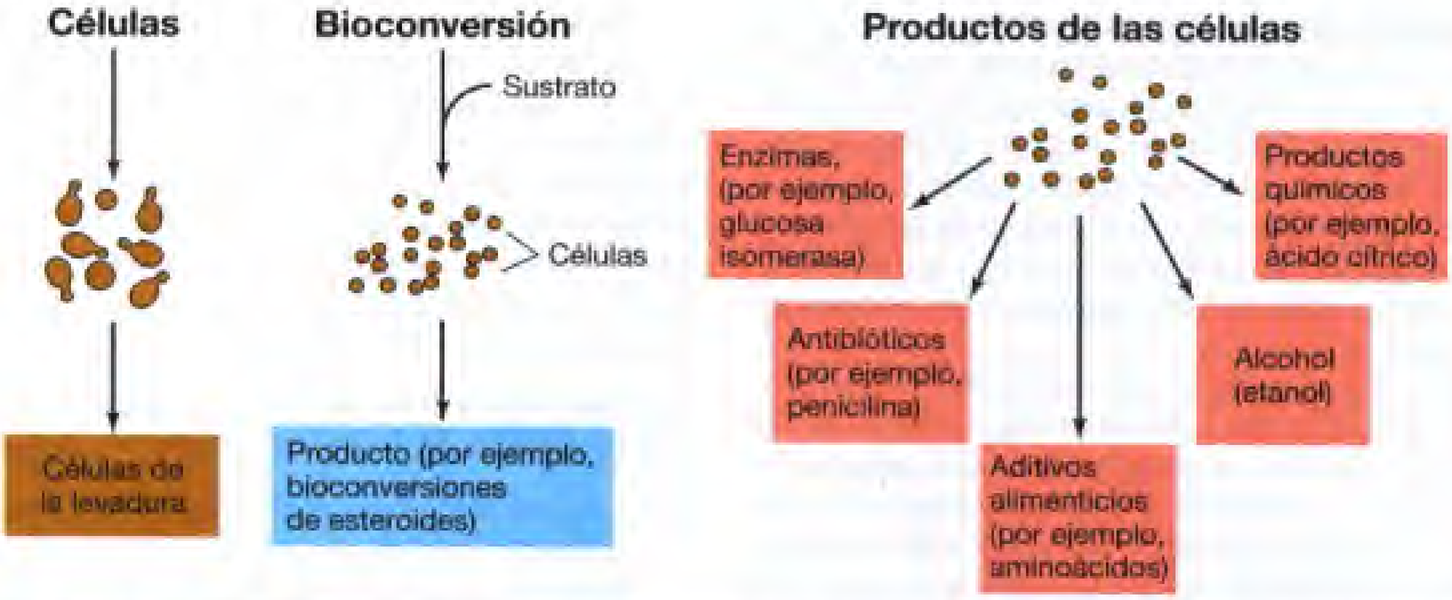

Células
Bioconversión
Sustrato
Células
Productos de las células
Enzimas, (por ejemplo, glucosa isomerasa)
Productos químicos (por ejemplo, ácido cítrico)
Antibióticos (por ejemplo, penicilina)
Alcohol (etanol)
Células de la levadura
Producto (por ejemplo, bioconversiones de esteroides)
Aditivos alimenticios (por ejemplo, aminoácidos)

Figura 30.1 Productos de la microbiología industrial o biocatalisis. Los productos pueden ser las propias células o productos fabricados por las células. En el caso de la bioconversión, las células se utilizan para convertir químicamente una forma de una sustancia específica en otra forma distinta.

nes, como las patentes y los derechos de propiedad entre ellos, las cepas depositadas *no* son las cepas que realmente producen los rendimientos elevados, sino que se trata de la cepa o cepas que realizan el proceso con bajo rendimiento.

Propiedades de un microorganismo con valor de interés industrial

Un microorganismo que pueda usarse en la industria debe porducir, por supuesto, la sustancia de interés, pero se trata de mucho más. El organismo debe ser capaz de crecer y sintetizar el producto en cultivo a gran escala. Además, preferiblemente, el organismo debe producir esporas o alguna otra forma de célula reproductiva de modo que pueda se fácilmente inoculada en grandes fermentadores.

Otra característica importante de un organismo industrial es que debe crecer rápidamente y sintetice el producto deseado, en un periodo relativamente corto de tiempo. El microorganismo también debe ser capaz de crecer en un medio de cultivo líquido relativamente barato, que se obtenga en grandes cantidades. Muchos procesos microbiológicos indutriales utilizan productos de desecho carbonados provenientes de otras industrias, para los medios de cultivo a gran escala. Por ejemplo, el *licor de maceración del maíz* (un producto de la industria del molido y maceración del maíz mojado humedecido que es rico en nitrógeno y factores de crecimiento), *suero de la leche* (un líquido residual de la industria láctea que contiene lactosa y minerales), y otros materiales residuales de la industria con elevado contenido en carbono orgánico. Además, un microorganismo industrial no debe ser patógeno, especialmente para el hombre, o para animales o plantas. Debido al enorme tamaño de la población microbiana de un fermentador industrial y que es prácticamente imposible evitar la contaminación del ambiente fuera del fermentador, la presencia de un patógeno supondría un ploblema desastroso. Por último, un microorganismo debe ser susceptible de ser manipulado genéticamente. En microbiología indutrial, a menudo se ha incrementado genéticamente el rendimiento, mediante mutación y selección. Por tanto, disponer de un microorganismo productor estable y fácilmente manipulable es una clara ventaja.

Ejemplos de productos industriales

Los productos microbianos con interés industrial son de varios tipos principales (Figura 30.1). Estos son las células propiamente dichas, por ejemplo, levaduras cultivadas para alimentos, panadería o cerveza (*véase* Figura 30.20), y sustancias producidas por las células. Ejemplos de éstas últimas son la glucosa isomerasa, agentes farmacológicamente activos como los antibióticos, esteroides y alcaloides, particularmente porductos químicos y aditivos alimentarios tales como el popular aspartamo, edulcorante de alimentos y bebidas; y productos químicos comnes como el etanol. En la Figura 30.1 se resumen de algunos de los productos indutriales importantes, muchos de los cuales se comentarán con más detalle posteriormente.

✓ 30.1 Revisión de conceptos

Un microorganismo industrial debe sintetizar el producto de interés con alto rendimiento, crecer rápidamente en medios de cultivo baratos disponibles en grandes cantidades, ser susceptible de manipulación genética y, si es posible, no ser patógeno. Son muchos los productos indutriales, e incluyen tanto células como sustancias hechas por las células.

- ✓ ¿Por qué los microorganismos industriales deben ser genéticamente manipulables?
- ✓ Cite tres productos importantes obtenidos por biocatálisis química.

30.2 Crecimiento y formación del producto en biocatálisis

En la Sección 6.1 explicamos el proceso de crecimiento microbiano en varias fases: de *latencia, exponencial* y *estacionaria*. Aquí describimos el crecimiento microbiano y la formación del producto en un contexto industrial y nos preguntamos: «¿Cuándo se produce el metabolito industrialmente útil en el ciclo celular?»

Metabolitos primarios y secundarios

Hay dos tipos básicos de metabolitos microbianos: primarios y secundarios. Un *metabolito primario* es el que se forma durante la fase exponencial de crecimiento, mientras que un *metabolito secundario* es el que se forma casi al final de la fase exponencial de crecimento, con frecuencia muy cerca de o ya en la fase estacionaria de crecimento. La diferencia entre un metabolito primario y un metabolito secundario se ilustra en la Figura 30.2.

Un típico proceso microbiano en el que el producto se forma en la fase primaria de crecimento es la *fermentación alcohólica (etanol)**: el etanol es un producto del metabolismo anaeróbico de las levaduras y algunas bacterias (*véase* Sección 5.10) y se forma como parte del metabolismo energético. Dado que el crecimiento puede ocurrir sólo si se produce energía, la formación de etanol tiene lugar paralelamente al crecimiento (Figura 30.2*a*).

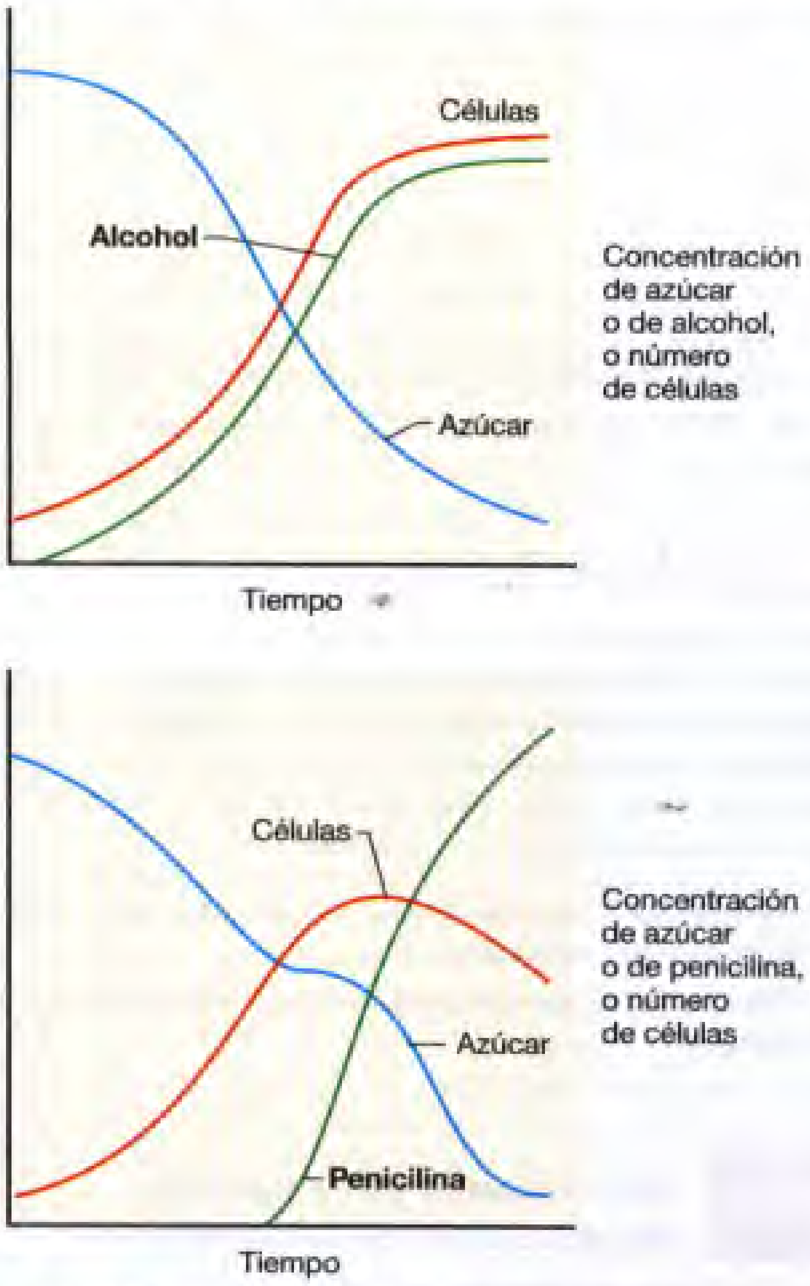


Figura 30.2 Diferencias entre la producción de metabolitos primarios y secundarios. (a) Formación de alcohol por parte de la levadura, un ejemplo de un metabolito *primario*. (b) Producción de penicilina por el hongo *Penicillium chrysogenum*, un ejemplo de metabolito *secundario*. Observe que la penicilina no se produce hasta que el crecimiento ha entrado en la fase media (*véase* Figura 6.8).

A diferencia de lo que hemos visto para la producción de etanol por levaduras, en algunos procesos biocatalíticos el producto deseado no se sintetiza durante la fase activa de crecimiento sino durante la fase *estacionaria*. Los metabolitos producidos durante la fase estacionaria se denominan **metabolitos secundarios** y son algunos de los metabolitos más comunes e importantes desde el punto de vista industrial (Figura 30.2*b*). Las características de los metabolitos secundarios son las siguientes:

1. Los metabolitos secundarios no son esenciales para el crecimiento y la reproducción.
2. La formación de metabolitos secundarios depende fundamentalmente de las condiciones de cultivo, sobre todo de la composición del medio.
3. A menudo los metabolitos secundarios se producen como un grupo de estructuras muy relacionadas. Por ejemplo, se ha encontrado que una única cepa de una especie de *Streptomyces* produce alrededor de 30 antibióticos antraciclina diferentes pero relacionados.
4. Se puede incrementar enormemente la *sobreproducción* de los metabolitos secundarios, mientras que los metabolitos primarios, asociados al metabolismo primario, habitualmente no pueden sobreproducirse en la misma medida.

Relación entre metabolismo primario y secundario

La mayoría de los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas complejas que requieren un gran número de reacciones enzimáticas específicas para su síntesis. Por ejemplo, se sabe que al menos 72 reacciones enzimáticas distintas están implicados en la síntesis del antibiótico *tetraciclina* (*véase* Sección 30.6), y unas 25 reacciones en la síntesis de la *eritromicina;* ninguna de ellas tiene lugar durante el metabolismo primario. No obstante, las rutas metabólicas de estos metabolitos secundarios provienen del metabolismo primario, porque las moléculas precursoras para el metabolismo secundario se forman en las principales rutas biosintéticas primarias. Esto se resume en la Figura 30.3, que muestra la relación entre la principal ruta metabólica primaria para la síntesis de aminoácidos aromáticos con las rutas del metabolismo secundario para una serie de antibióticos. Como puede observarse, muchos metabolitos secundarios estructuralmente complejos se originan a partir de moléculas precursoras con una estructura muy similar (Figura 30.3).

✓ 30.2 Revisión de conceptos

Los metabolitos primarios y secundarios se producen durante el crecimiento activo de las células o cerca de la fase estacionaria, respectivamente. Muchos productos de origen microbiano con valor económico son metabolitos secundarios.

- ✓ ¿La penicilina es un metabolito *primario* o *secundario*? ¿Por qué?
- ✓ ¿Qué tipo de metabolito, primario o secundario, puede sobreproducirse más fácilmente? ¿Por qué?

---

* En microbiología industrial, el término *fermentación* se refiere a cualquier proceso microbiano a gran escala, sea no sea bioquícamente una fermentación. De hecho, la mayoría de las fermentaciones industriales son aeróbicas. El *tanque* en el cual se lleva a cabo la fermentación industrial se denomina fermentador y el microorganismo implicado es el agente de la fermentación.

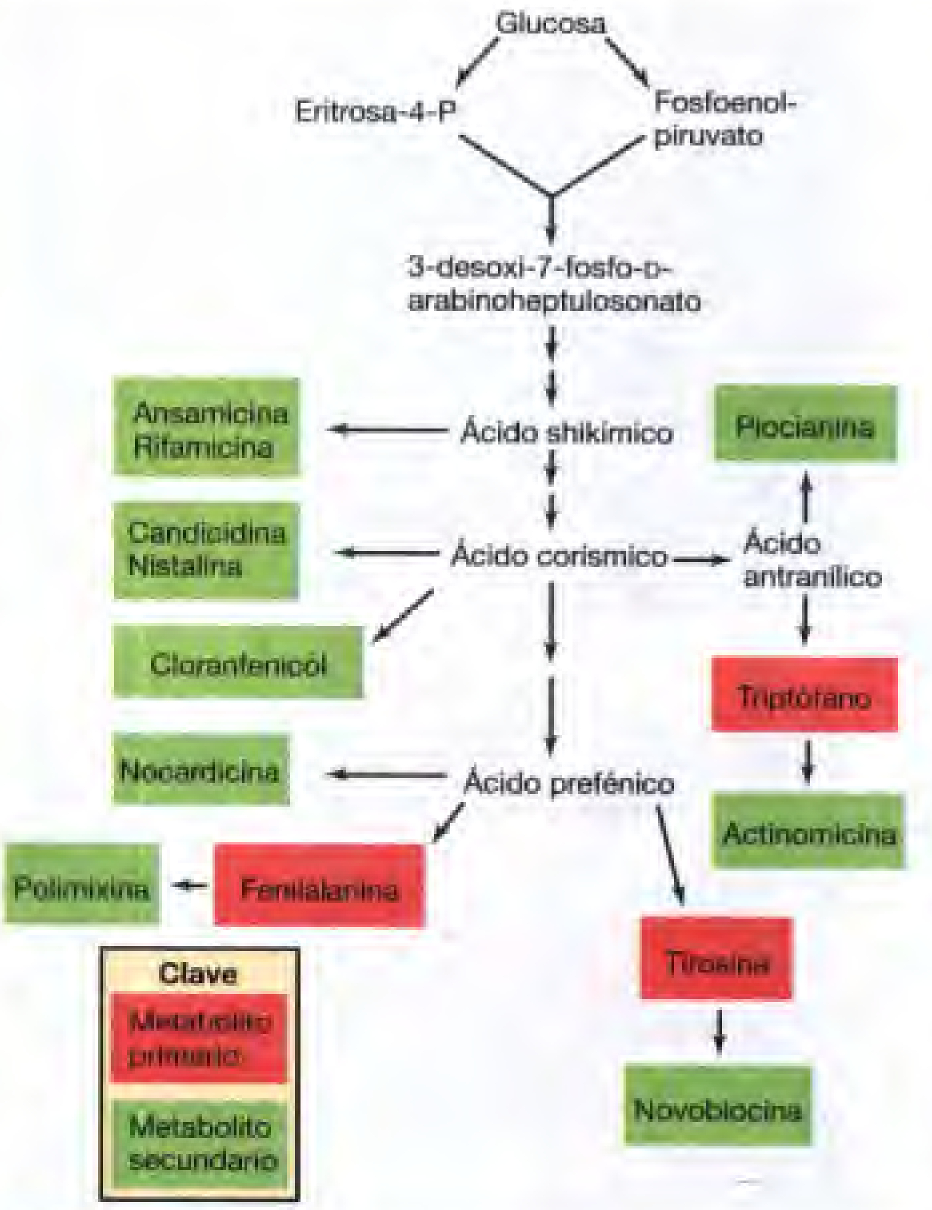


Figura 30.3 Relación entre la vía metabólica primaria para la síntesis de aminoácidos aromáticos (*véase* Sección 5.15) y la formación de una variedad de antibióticos de metabolitos secundarios que contienen anillos aromáticos. Observe que éste es un esquema compuesto de los procesos que ocurren en diversos microorganismos. Ningún microorganismo produce todos estos metabolitos secundarios y en todos los casos existen muchos pasos individuales entre el aminoácido y el antibiótico.

30.3 Características de las fermentaciones a gran escala

El contenedor recipiente en el que se realiza el proceso industrial se denomina *fermentador*. Los fermentadores varían de tamaño, desde un fermentador pequeño de 5-10 litros de capacidad para producción a escala de laboratorio (Figura 30.4*a*), hasta de 500 000 litros a escala industrial. Por tanto, el tamaño del fermentador utilizado dependerá del proceso y de cómo se realice éste. En la Tabla 30.1 se muestra un resumen de los tamaños de los fermentadores empleados en algunas fermentaciones microbianas.

Los fermentadores industriales pueden dividirse en dos clases principales, según se trate de procesos *anaeróbicos* o *aeróbicos*. Los fermentadores anaeróbicos requieren poco equipamiento especial, excepto el necesario para eliminar el exceso de calor generado durante la fermentación, mientras que los fermentadores aeróbicos requieren un equipamiento mucho más especial, para garantizar que se consiga el mezclado y la aireación adecuados.

Construcción de un fermentador aeróbico

Los fermentadores a escala industrial casi siempre se fabrican en acero inoxidable. Este tipo de fermentadores consisten esencialmente en un cilindro largo, cerrado en la parte superior e inferior, dotado de varias válvulas y tuberías (Figura 30.4*b*). Debido a que la esterilización del medio de cultivo y la eliminación del calor generdo son fundamentales para que la operación (fermentación) se realice con éxito, generalmente el fermentador posee una *cubierta refrigerante* externa por la que se hace pasar una corriente de vapor o de agua. En el caso de los fermentadores para grandes volúmenes, la transferencia de calor a través de la cubierta refrigerante es insuficiente, por lo que este tipo de fermentadores va equipado con una serie de *refrigerantes internos* a través de los cuales pasa vapor o agua.

Una de las partes críticas de un fermentador es el *sistema de aireación*. Con equipos a gran escala, la transferencia de oxígeno desde el gas al medio líquido es crucial, porque se toman precauciones especiales que aseguren una aireación correcta. El oxígeno es poco soluble en agua y, en un fermentador con una elevada densidad de población microbiana, la demanda de oxígeno —por parte del cultivo— es tremenda. Con el fin de asegurar la correcta aireación del cultivo, se emplean dos tipos de sistemas separados: un dispositivo de aireación, llamado *difusor*, y un dispositivo giratorio de agitación, llamado *impulsor*, (Figura 30.4*b*). El difusor es un dispositivo, a menudo una serie de agujeros en un anillo metálico o placa, a través de los cuales se introduce en el fermentador aire filtrado estéril a alta presión. El aire entra en el fermentador en forma de diminutas burbujas desde las que el oxígeno pasa al medio líquido por difusión.

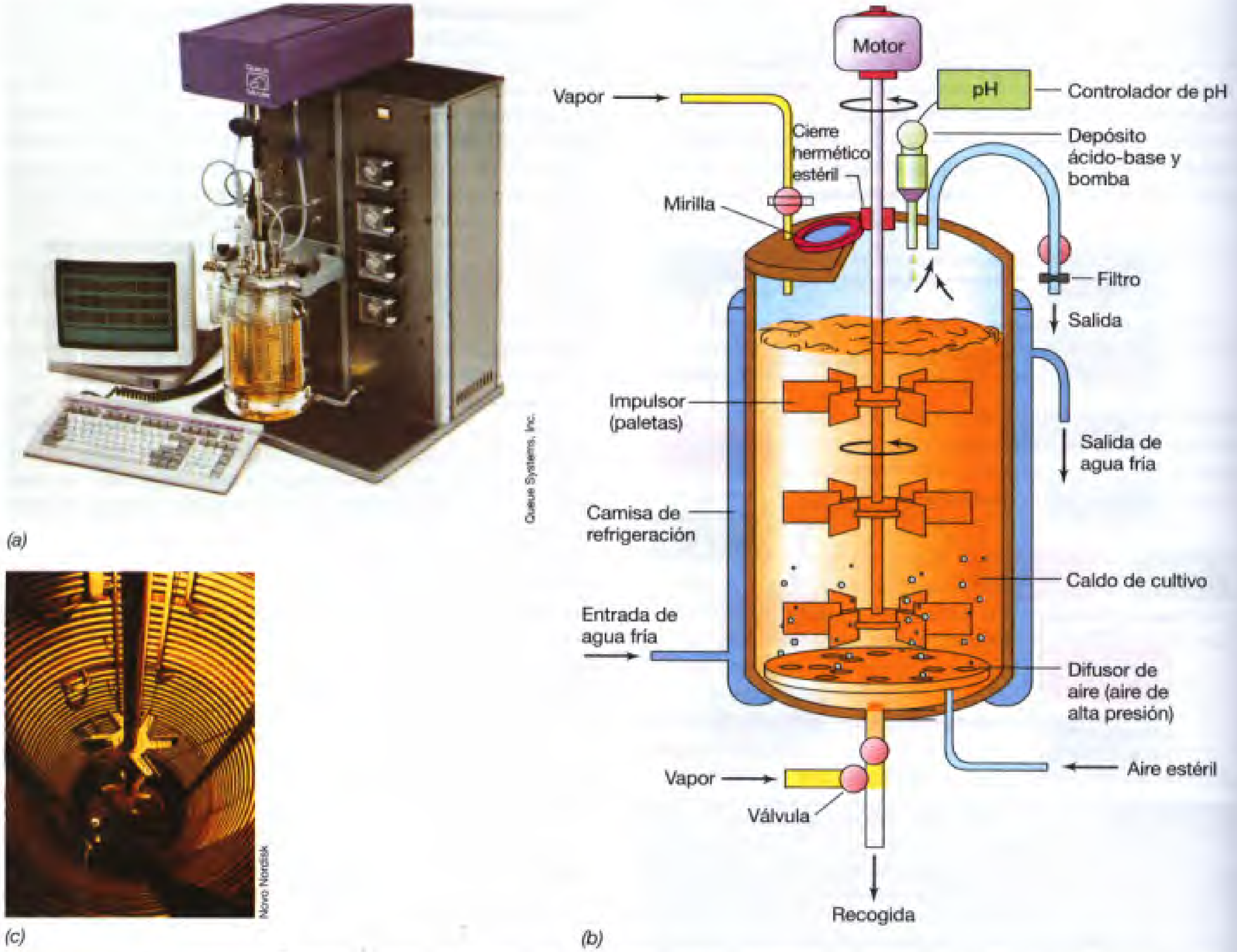
En los fermentadores pequeños, un difusor sparger sólo puede ser suficiente para asegurar la correcta aireación, pero en los fermentadores industriales la *agitación* de la mezcla de fermentación con un impulsor es esencial (Figura 30.4*c*). Con la agitación se consiguen dos cosas: la mezcla de las burbujas de gas a través del medio líquido y la mezcla del microorganismo en el medio de cultivo, garantizándose así el acceso uniforme de las células microbianas a los nutrientes.

En la Figura 30.5 se muestra un fermentador a gran escala típico.

Control y monitorización del proceso de fermentación

Cualquier fermentación microbiana debe monitorizarse para garantizar que el proceso transcurra de forma correcta, pero es especialmente importante que los fementadores industriales se controlen cuidadosamente debido al elevado coste de la operación. En la mayoría de los casos, no sólo es necesario medir el crecimiento del cultivo y la formación del producto, sino también *controlar* el proceso modificando los parámetros ambientales a medida que tiene lugar dicho proceso. Los factores ambientales que se controlan con mayor frecuencia son la temperatura, la concentración de oxígeno, el pH, la masa celular y la concentración del producto.

Durante el crecimiento y el proceso de formación del producto en una fermentación a gran escala es esencial, para que la fermentación sea correcta, que durante el proceso se obtengan los datos a tiempo real. Por ejemplo, puede ser que


(a)
(b)
(c)
Motor
Vapor
pH
Controlador de pH
Cierre hermético estéril
Depósito ácido-base y bomba
Mirilla
Filtro
Salida
Impulsor (paletas)
Salida de agua fría
Camisa de refrigeración
Caldo de cultivo
Entrada de agua fría
Difusor de aire (aire de alta presión)
Vapor
Aire estéril
Válvula
Recogida

Queue Systems, Inc.

Novo Nordisk

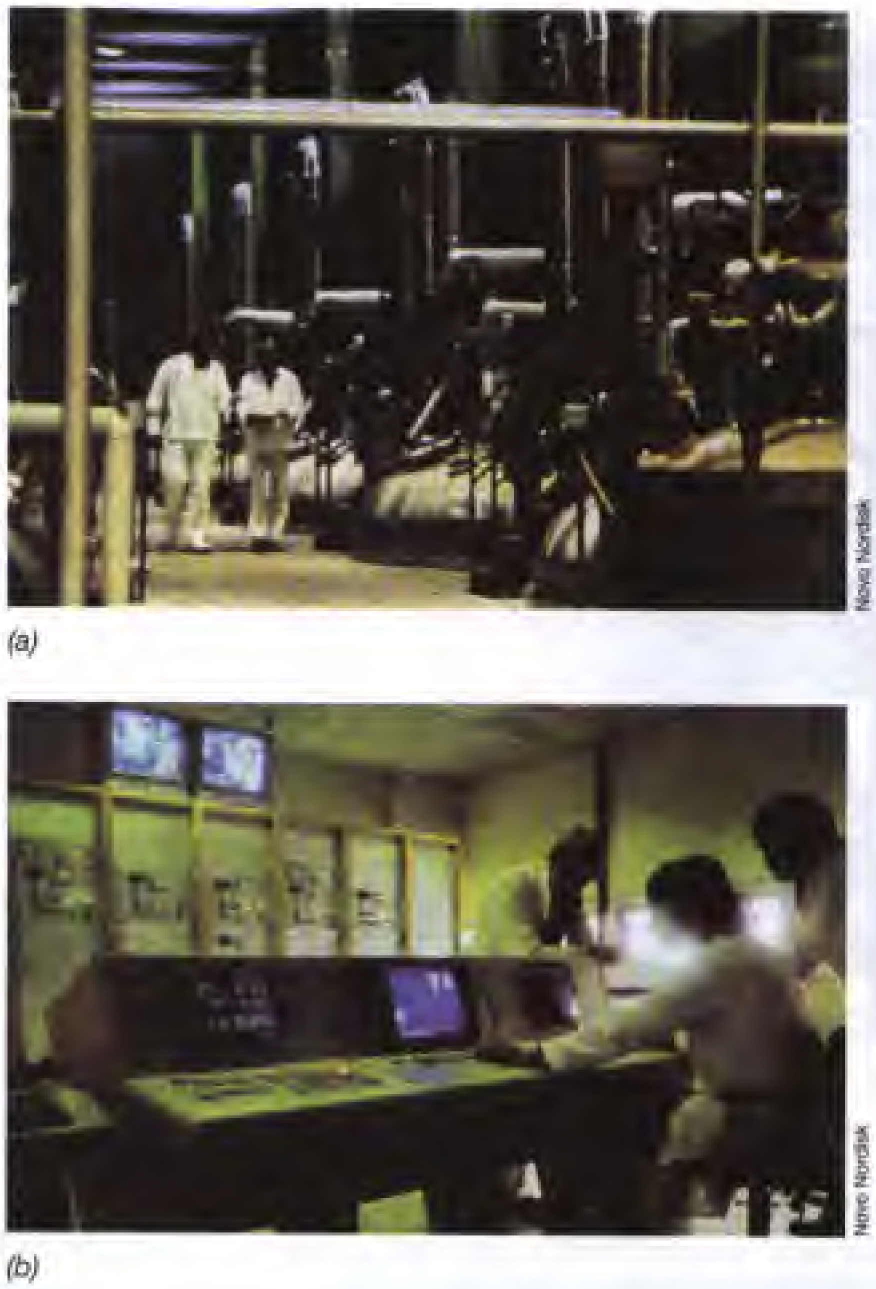
Figura 30.4 Fermentadores. (a) Pequeño fermentador para investigación. El volumen es de cinco litros. (b) Esquema de un fermentador que muestra la construcción y los dispositivos que se utilizan para la aireación y el proceso de control. (c) Interior de un fermentador industrial, que muestra las paletas y los serpentines internos para calentar y enfriar. En una fermentación industrial típica, los procesos de aireación y enfriamiento son los componentes clave para la monitorización y el ajuste en línea. Los niveles de nutrientes y el pH se controlan también de forma estricta para realizar los ajustes de forma automática siempre que sea necesario.

TABLA 30.1 Tamaños de fermentador para diversos procesos industriales

Tamaño del fermentador (en litros)	Producto
1 a 20 000	Enzimas para diagnóstico, sustancias para biología molecular
40 a 80 000	Algunas enzimas, antibióticos
100 a 150 000	Penicilina, antibióticos aminoglicósidos, proteasas, amilasas, transformación de esteroides, aminoácidos, vino, cerveza
200 000 a 500 000	Aminoácidos (ácido glutámico), vino, cerveza

sea necesario cambiar uno de los parámetros ambientales a medida que la fermentación progrese, o añadir un nutriente en la cantidad y la velocidad adecuadas para que el crecimiento se equilibre exactamente. Los computadores controlan y procesan este tipo de datos *on-line*, y responden a las necesidades añadiendo nutrientes para evitar que esos nutrientes sean utilizados en la síntesis de productos indeseados, deviándolos de la formación del producto deseado.

Los computadores también se utilizan en la *modelización* del proceso de fermentación. Los modelos matemáticos verifican el efecto de diversos parámetros sobre el crecimiento y rendimiento del producto de una forma rápida e interactiva, y luego los modifican para ver cómo afectan al proceso. De esta manera, muchas variaciones en la fermentación pueden estudiarse sin apenas coste alguno en la pantalla del computador, en vez de en una planta piloto o en una planta industrial, lo que sería mucho más caro (*véase* la siguiente sección).



Novo Nordisk

Novo Nordisk

Figura 30.5 (a) Una gran planta de fermentación. Sólo se ve la parte superior de los fermentadores, que pueden tener una altura de varios pisos. (b) Habitación de control por ordenador para una gran planta de fermentación.

✓ 30.3 Revisión de conceptos

Las fermentaciones industriales a gran escala presentan varios problemas en cuanto a su ingeniería y diseño. Los procesos aeróbicos necesitan mecanismos que aseguren la agitación y aireación. Los procesos microbianos tienen que controlarse continuamente para garantizar un rendimiento satisfactorio del producto deseado.

- ✓ ¿Cuáles son los dispositivos que se usan para garantizar la correcta aireación en una fermentación a gran escala?
- ✓ ¿Cuáles son los parámetros que se controlan en una fermentación industrial, y qué rejustes y modificaciones tienen que hacerse mediante un control computerizado?

30.4 Escalado de la fermentación

Uno de los aspectos más importantes de la microbiolgía industrial es la transferencia de un proceso desde la pequeña escala de un equipo de laboratorio hasta un equipo comercial a gran escala, proceso llamado **escalado.** El conocimiento de los problemas que supone el escalado es de capital importancia porque raramente un proceso biocatalítico se comporta de la misma manera en los fermentadores a gran escala que en un equipo de laboratorio de pequeña escala (Figura 30.6).

¿Por qué es diferente un proceso microbiano que se realiza en un equipo a gran escala de uno a pequeña escala? Por una razón, el mezclado y la aireación son mucho más fáciles de lograr en un matraz o en un fermentador pequeño de laboratorio, que en un gran fermentador industrial. Especialmente, la transferencia de oxígeno se consigue mucho más difícilmente en un fermentador grande y, dado que la mayoría de las fermentaciones industriales son procesos aeróbicos, la transferencia de oxígeno es fundamental. Con el medio de cultivo rico que se emplea en los procesos industriales, se obtiene una gran cantidad de biomasa, lo que conlleva una gran demanda de oxígeno. Si se reduce la aireación, incluso por un corto periodo de tiempo, temporalmente el cultivo estará en condiciones anóxicas, con serias consecuencias en términos de rendimiento de producción. El escalado de un proceso industrial es tarea del *ingeniero bioquímico,* quien está familiarizado con aspectos como la transferencia de gases, dinámica de fluidos, mezclado y termodinámica del proceso.

El proceso de escalado

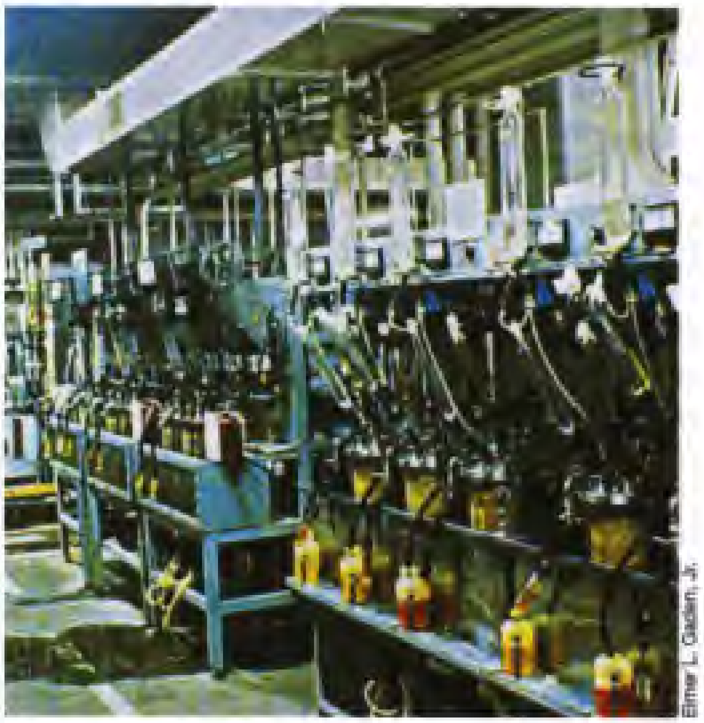
Para transferir un proceso industrial desde el laboratorio al fermentador comercial, es necesario realizar varias fases: (1) Experimentos en *matraz de laboratorio* que, generalmente, constituye la primera indicación de que un proceso con interés industrial es factible. (2) El *fermentador de laboratorio,* un fermentador a pequeña escala, generalmente de vidrio de 1 a 10 litros de capacidad, en el que se hacen los primeros ensayos de escalado (Figuras 30.4*a* y 30.6*a*). En el fermentador de laboratorio es posible ensayar variaciones en el medio, temperatura, pH, etc., sin grandes gastos, dado el relativamente bajo costo tanto del equipo como del medio de cultivo. (3) Cuando los ensayos en el fermentador del laboratorio tienen éxito, el proceso pasa a una *planta piloto,* en equipos de 300 a 3000 litros de capacidad. Aquí las condiciones se aproximan más a las de una escala comercial; no obstante, el costo aún no es el principal factor limitante. (4) Por último, el proceso pasa al *fermentador comercial,* de 10 000 a 500 000 litros de capacidad (Figuras 30.5*a* y 30.6*b*). En todas las fases del escalado la aireación está muy controlada. A medida que se avanza en el escalado desde el matraz al fermentador de producción, la dinámica de la cantidad de O_2 se mide cuidadosamente en cada etapa para determinar cómo el incremento del volumen afecta a la demanda de O_2 en la fermentación.

En resumen, el escalado de un proceso biocatalítico puede ser enormemente complejo y precisa del conocimiento, no sólo de la biología del microorganismo productor, sino también de la geometría del diseño del fermentador y de su manejo.

✓ 30.4 Revisión de conceptos

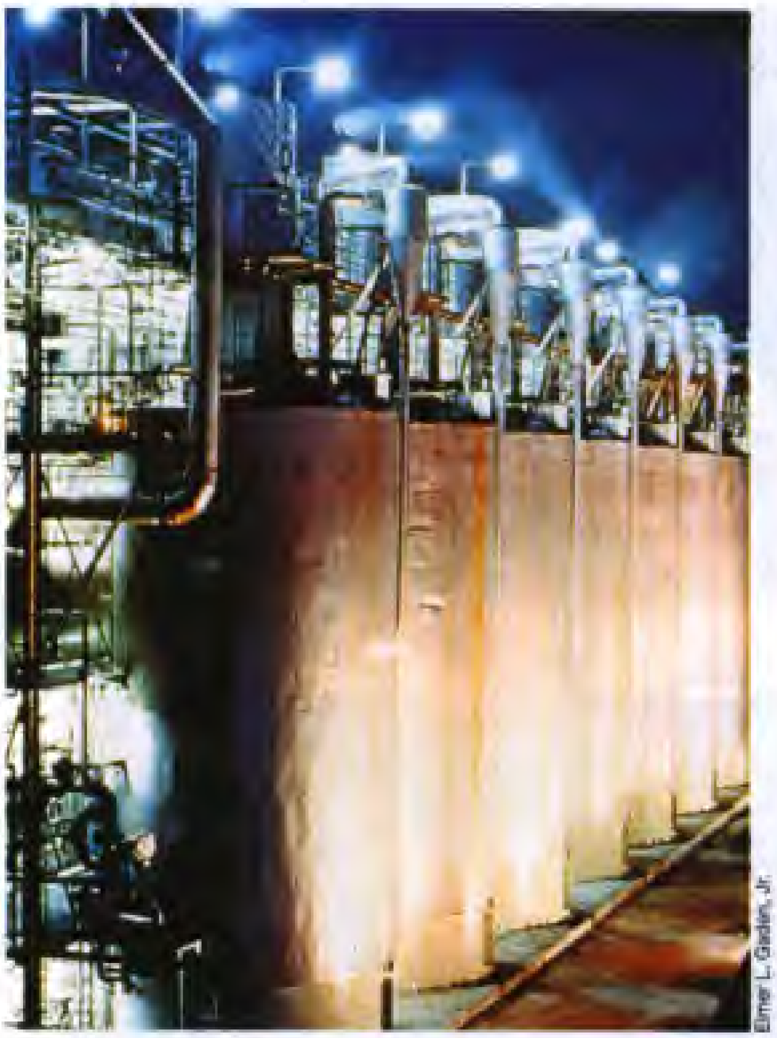
El escalado es el proceso de conversión gradual de una fermentación con interés industrial desde la escala de laboratorio hasta la escala de producción industrial. La aireación es uno de los aspectos especialmente críticos que es necesario controlar en los estudios de escalado.

- ✓ ¿Cuáles son las diferencias de tamaño entre un fermentador de laboratorio típico, un fermentador de una planta piloto y un fermentador comercial?



Elmer L. Gaden, Jr.

(a)



Elmer L. Gaden, Jr.

(b)

Figura 30.6 (a) Batería de pequeños fermentadores de investigación utilizados en el desarrollo de procesos. Los fermentadores son las vasijas de vidrio con las partes superiores de acero inoxidable. Las pequeñas botellas de plástico sirven para recoger el flujo que se desborda. (b) Una gran batería de fermentadores industriales al aire libre (240 m^3) que se utilizan en la producción comercial de alcohol en Japón. Dada la gran diferencia de sus tamaños, la misma fermentación microbiana tendría que dirigirse de forma muy distinta en los dos tipos de fermentadores.

II PRINCIPALES PRODUCTOS DE LA MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

Consideramos ahora la producción industrial de productos microbianos, comenzando con los antibióticos. La producción de antibióticos es una de las más potentes industrias a nivel mundial y donde de desarrollaron inicialmente muchos principios importantes de los cultivos microbianos a gran escala.

30.5 Antibióticos: aislamiento y caracterización

De los productos de origen microbiano que se fabrican comercialmente, probablemente los antibióticos son los más importantes. Como se expuso en el Capítulo 20, los antibióticos son sustancias químicas producidas por microorganismos que matan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos. El desarrollo de los antibióticos como agentes para el tratamiento de las enfermedades infecciosas ha sido el que, sin ningún género de duda, ha tenido el mayor impacto en la práctica de la medicina, mucho más que cualquier otro descubrimiento. Los antibióticos son los metabolitos secundarios típicos (*véase* Sección 30.2). Aquéllos que se usan comercialmente son producidos inicialmente por hongos filamentosos y por *Bacteria* del grupo de los actinomicetos (*véase* Sección 12.24). En la Tabla 30.2 se recoge una lista de los antibióticos más importantes producidos por fermentación a gran escala.

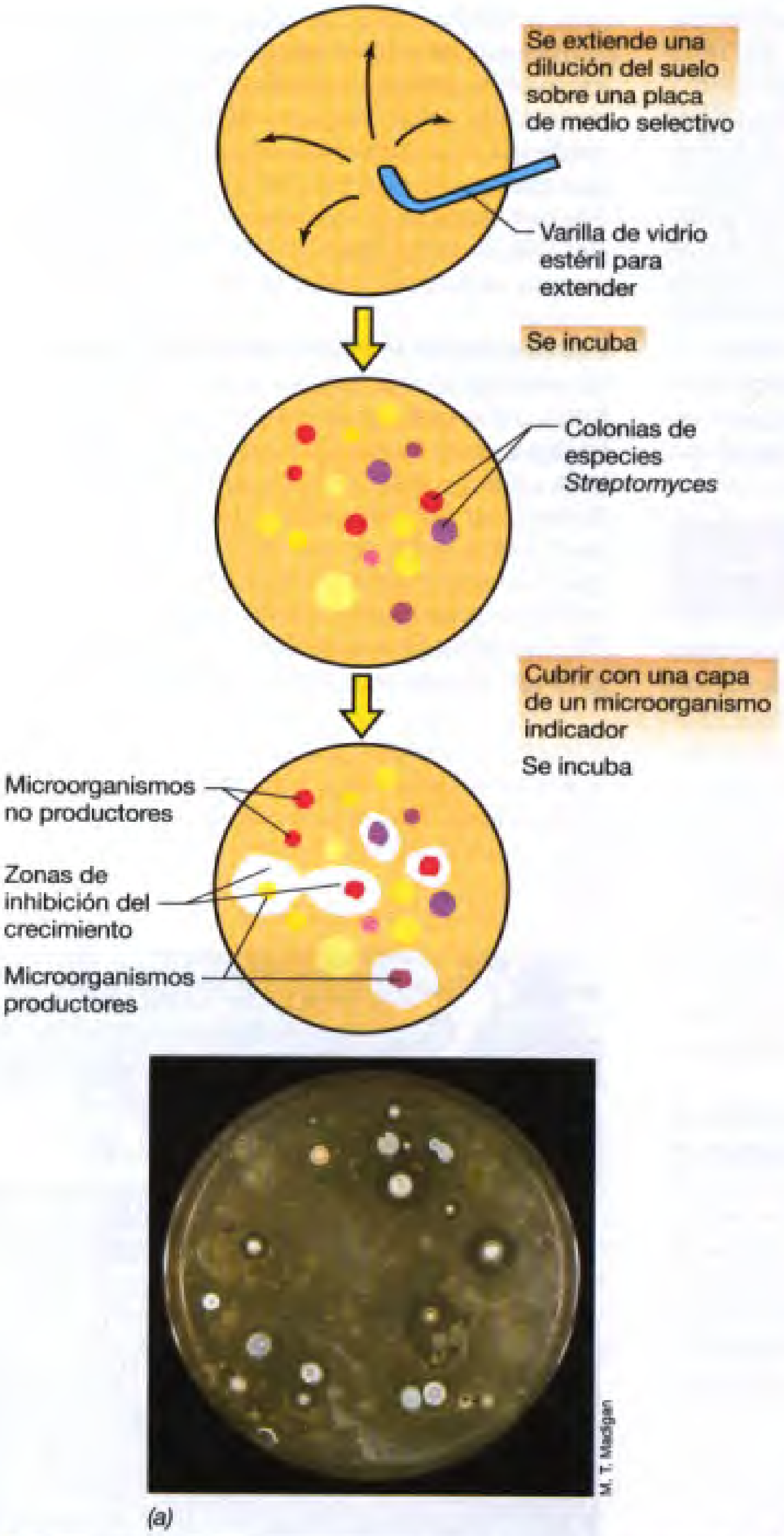
Búsqueda de nuevos antibióticos

Aunque las compañías farmacéuticas actualemente realizan gran parte de la búsqueda y descubrimiento de nuevos medicamentos por modelización computerizada (*véase* Seccción 20.13), la forma tradicional por la que se descubren nuevos antibióticos consiste en el *rastreo* (*screening*). Con este tipo de aproximación se aísla de la naturaleza, en cultivo axénico (puro), un gran número de posibles microorganismos productores de antibióticos (Figura 30.7*a*), y en

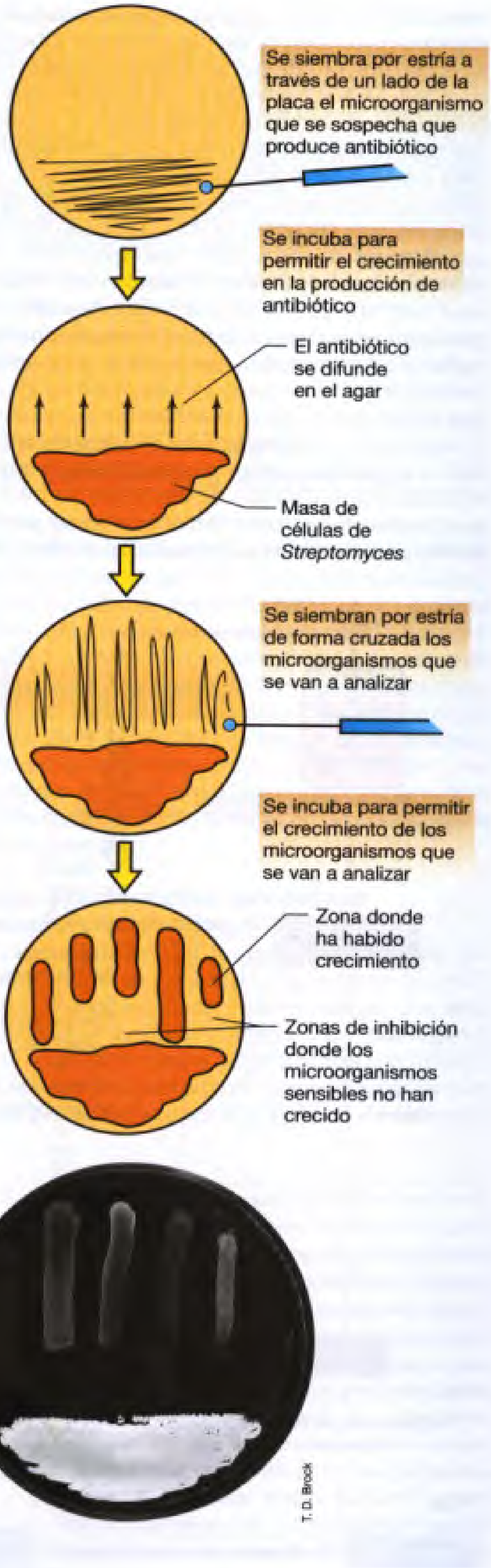
TABLA 30.2 Algunos antibióticos producidos comercialmente

Antibiótico	Microorganismo productor[a]
Bacitracina	*Bacillus licheniformis* (EFB)
Cefalosporina	*Cephalosporium* sp. (F)
Cloranfenicol	Síntesis química (antiguamente producida microbiológicamente por *Streptomyces venezuelae*) (A)
Cicloheximida	*Streptomyces griseus* (A)
Cicloserina	*Streptomyces orchidaceus* (A)
Eritromicina	*Streptomyces erythreus* (A)
Griseofulvina	*Penicillium griseofulvin* (F)
Kanamicina	*Streptomyces kanamyceticus* (A)
Lincomicina	*Streptomyces lincolnensis* (A)
Neomicina	*Streptomyces fradiae* (A)
Nistatina	*Streptomyces noursei* (A)
Penicilina	*Penicillium chrysogenum* (F)
Polimixina B	*Bacillus polymyxa* (EFB)
Estreptomicina	*Streptomyces griseus* (A)
Tetraciclina	*Streptomyces rimosus* (A)

[a] EFB: bacteria formadora de endosporas; F: hongo; A: actinomiceto.


Se extiende una dilución del suelo sobre una placa de medio selectivo
Varilla de vidrio estéril para extender
Se incuba
Colonias de especies *Streptomyces*
Cubrir con una capa de un microorganismo indicador
Se incuba
Microorganismos no productores
Zonas de inhibición del crecimiento
Microorganismos productores
M. T. Madigan

(a)


Se siembra por estría a través de un lado de la placa el microorganismo que se sospecha que produce antibiótico
Se incuba para permitir el crecimiento en la producción de antibiótico
El antibiótico se difunde en el agar
Masa de células de *Streptomyces*
Se siembran por estría de forma cruzada los microorganismos que se van a analizar
Se incuba para permitir el crecimiento de los microorganismos que se van a analizar
Zona donde ha habido crecimiento
Zonas de inhibición donde los microorganismos sensibles no han crecido
T. D. Brock

(b)

Figura 30.7 Aislamiento y examen de productores de antibióticos. (a) Aislamiento utilizando medios selectivos para *Streptomyces* e identificación de los productores de antibióticos usando un microorganismo indicador. En la fotografía, la mayoría de las colonias son de especies *Streptomyces* y algunas de ellas están produciendo antibióticos, como indican los índices de inhibición del crecimiento del microorganismo indicador (*Staphylococcus aureus*) en torno a algunas colonias. (b) Método para probar el espectro de actividad antibiótico de un microorganismo. El productor (una especie de *Streptomyces*) se sembró por estría a través de un tercio de la placa y la placa se incubó a continuación. Tras obtener un buen crecimiento, las bacterias de prueba se sembraron por estría perpendicularmente al *Streptomyces* y la placa se incubó nuevamente. La incapacidad de algunos organismos para crecer cerca de la masa de crecimiento de *Streptomyces* indica que *Streptomyces* ha producido un antibiótico activo contra esas bacterias. Los organismos de prueba (izquierda a derecha) son: *Eschericia coli, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae* y *Mycobacterium smegmatis*.

estos aislamientos se ensaya la producción de antibióticos viendo si producen cualquier sustancia difusible que inhiba el crecimiento de ciertas bacterias usadas como control en el test. Dichas bacterias se seleccionan entre varios tipos bacterianos de modo que representen a, o estén relacionadas con, patógenos bacterianos. El procedimento clásico para ensayar la producción de antibióticos en los aislamientos microbianos nuevos es el método de siembra en estría en superficie (en placa), utilizado por primera vez por Fleming en sus estudios pioneros sobre la penicilina (*véase* el recuadro «La microbiología y las "balas mágicas"», en el Capítulo 20 y la Figura 30.7*b*). Aquellos aislamientos que sean candidatos en la producción de antibióticos se estudian posteriormente, a fin de saber si los antibióticos que producen son nuevos o no. La mayoría de los aislamientos que se obtienen producen antibióticos *conocidos*, por lo que el micorbiólogo industrial ha de identificar rápidamente dichos microorganismos para no perder tiempo ni medios estudiándolos. Cuando de descubre un microorganismo que produce un *nuevo* antibiótico, éste se produce en cantidades suficientes para proceder al análisis de su estructura, y después determinar su toxicidad y actividad terapéutica en animales infectados. Por desgracia, la mayoría de los nuevos antibióticos *fallan* el test en animales de experimentación, y sólo unos pocos tienen eficacia terapéutica en medicina y se producen comercialmente. No obstante, ya que el número de tipos de antibióticos diferentes producidos por especies del género *Streptomyces* se estima en unos 100 000, la investigación orientada al descubrimiento de nuevos antibióticos ocurre continuamente.

Purificación e incremento del rendimiento

Un antibiótico que vaya a producirse comercialmente, primero debe obtenerse con éxito en fermentadores industriales a gran escala. Ya comentamos el problema del escalado en la Sección 30.4. La siguiente dificultad consiste en desarrollar métodos eficientes de purificación. Dadas las cantidades bajas de antibiótico que están presentes en el medio líquido de fermentación, es necesario disponer de métodos para la extracción y purificación del antibiótico (Figura 30.8). Si el antibiótico es soluble en disolventes orgánicos, puede ser relativamente fácil purificarlo por ex-

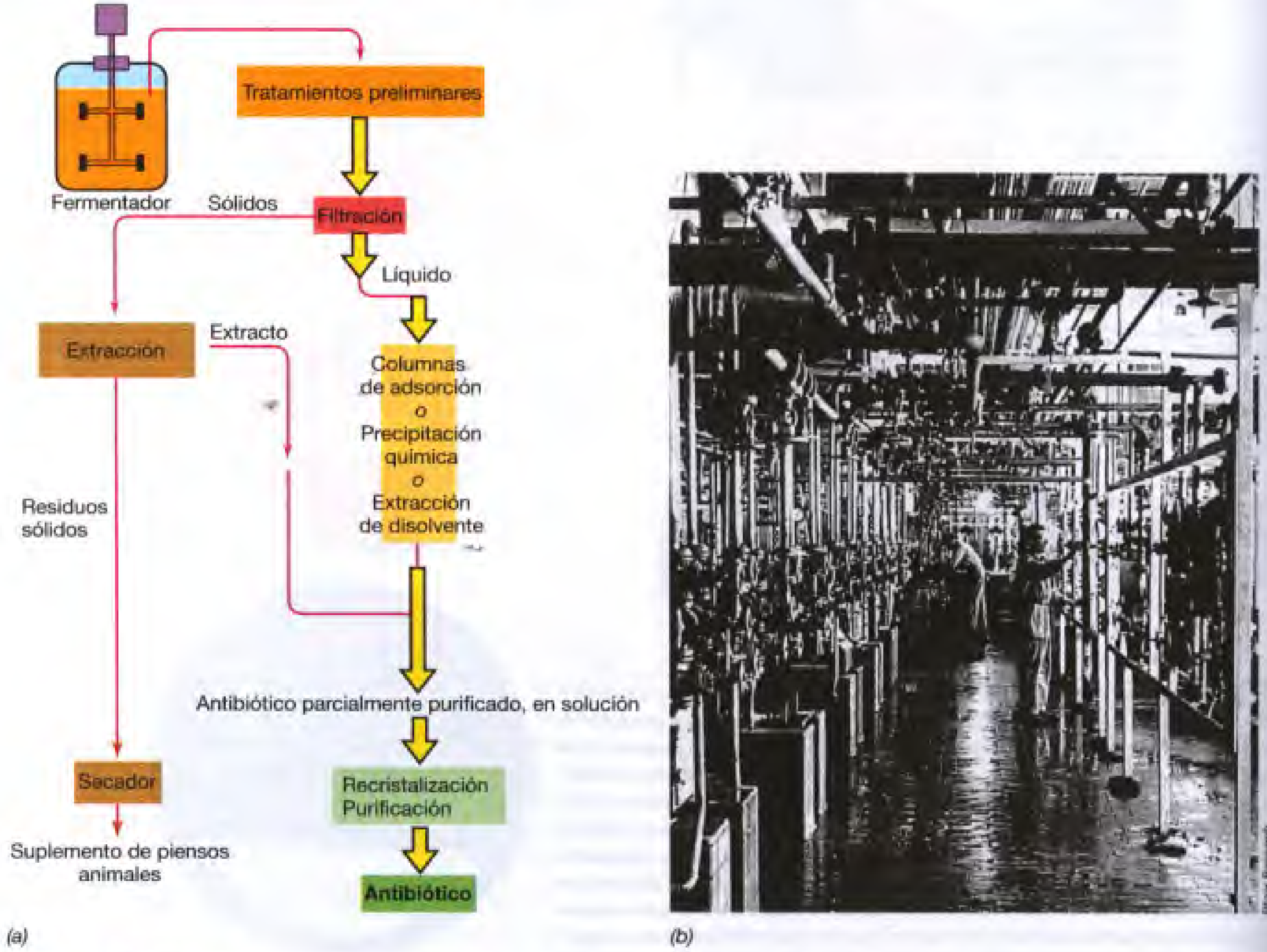

Fermentador
Sólidos
Tratamientos preliminares
Filtración
Líquido
Extracción
Extracto
Columnas de adsorción o Precipitación química o Extracción de disolvente
Residuos sólidos
Antibiótico parcialmente purificado, en solución
Secador
Recristalización Purificación
Suplemento de piensos animales
Antibiótico
(a)
(b)
Pfizer Research

Figura 30.8 Purificación de un antibiótico. (a) Proceso global de extracción y purificación. (b) Instalación para la extracción de un antibiótico a partir del caldo de fermentación mediante la utilización de un disolvente. La realización de una ingeniería eficaz es tan importante como los factores microbiológicos en la producción satisfactoria de un antibiótico.

tracción en un volumen pequeño del solvente. Pero si no lo es, entonces habrá de removerse del medio líquido del fermentador por adsorción, intercambio iónico o precipitación química (Figura 30.8). En cualquier caso, la finalidad es conseguir un producto cristalino de elevada pureza.

En muy raras ocasiones las cepas productoras de antibióticos que se aíslan directamente de la naturaleza producen el antibiótico deseado a una concentración suficientemente alta como para que su producción comercial empiece inmediatamente. Por eso, uno de los principales objetivos de un microbiólogo industrial es aislar *cepas de alto rendimiento*. La selección de las cepas implica la mutagénesis del cultivo inicial, siembra en placa de los mutantes y análisis de los mutantes en función de la producción de antibióticos. No obstante, la ingeniería genética ha mejorado enormemente este proceso. Por ejemplo, la técnica de la *amplificación génica* permite la inserción de copias adicionales de genes en una célula mediante un vector de clonación, como un plásmido (*véase* Capítulo 31). Modificando los procesos de regulación también puede incrementarse el rendimiento en la producción. Sin embargo, una de las dificultades en la utilización de los procesos de ingeniería genética para aumentar el rendimiento del antibiótico es que las rutas biosintéticas para la biosíntesis de la mayoría de los antibióticos implican gran número de etapas con muchos genes y, en muchos casos, no está claro qué genes deberían alterarse o expresarse en mayor número de copias para incrementar el rendimiento. Por tanto, es fundamental que la etapa limitante en una ruta bioquímica determinada se identifique previamente mediante investigación básica.

El rendimiento final es un aspecto clave en casi todos los compuestos farmacéuticos. Aun después de que la producción comercial de un antibiótico o de cualquier otro producto haya comenzado, se sigue investigando en la búsqueda, identificación o mejora de cepas con alto rendimiento de producción, o en la modificación del proceso a fin de incrementar el rendimiento del mismo. Aunque la producción de medicamentos se realice a baja escala, si se compara con la de productos químicos comunes que se consumen a granel o productos para la agricultura, existen buenas razones de tipo económico para alcanzar los rendimientos más altos posibles en el menor tiempo.

✓ 30.5 Revisión de conceptos

La producción indutrial de antibióticos comienza con la búsqueda y selección (rastreo) de microorganismos productores de antibióticos. Una vez que se han identificado los nuevos productores, se procede a la purificación y el análisis químico del agente antimicrobiano. Si el nuevo antibiótico es biológicamente activo *in vivo*, el microbiólogo industrial puede modificar genéticamente la cepa productora para aumentar el rendimiento, hasta niveles aceptables para su comercialización.

- ✓ ¿Cuál es el hábitat natural de la mayoria de los microorganimos productores de antibióticos?
- ✓ ¿Qué significa el término *rastreo* (*screening*) en el contexto de la búsqueda de nuevos antibióticos?

30.6 Producción industrial de penicilinas y tetraciclinas

Una vez que el antibiótico se ha caracterizado estructuralmente, se ha probado su eficacia terapéutica y bajo grado de toxicidad ensayándolo en animales de experimentación y, por último, ha pasado las diferentes fases de los ensayos clínicos (triales) (esta secuencia de ensayos puede durar varios años según los protocolos actuales), está listo para producirse comercialmente y venderse. Para antibióticos como la penicilina y la tetraciclina, hace años que superaron estos obstáculos; en la actualidad se fabrican, literalmente, toneladas de estos antibióticos para uso en medicna y veterinaria. Aquí nos centraremos en la producción industrial de estos dos antibióticos, como ejemplo de la producción de antibióticos en general.

Antibióticos β-lactámicos: penicilinas y compuestos relacionados

Como se vio en la Sección 20.8, las penicilinas son una clase de antibióticos que se caracterizan por tener un *anillo β-lactámico* y son producidos por varios hongos (eucariotas) de los géneros *Penicillium* y *Aspergillis*, y por algunos procariotas (Figura 30.9). Entre las penicilinas con utilidad en clínica se conocen varias formas, y estos derivados pueden proceder de las reacciones biocatalítica de síntesis y

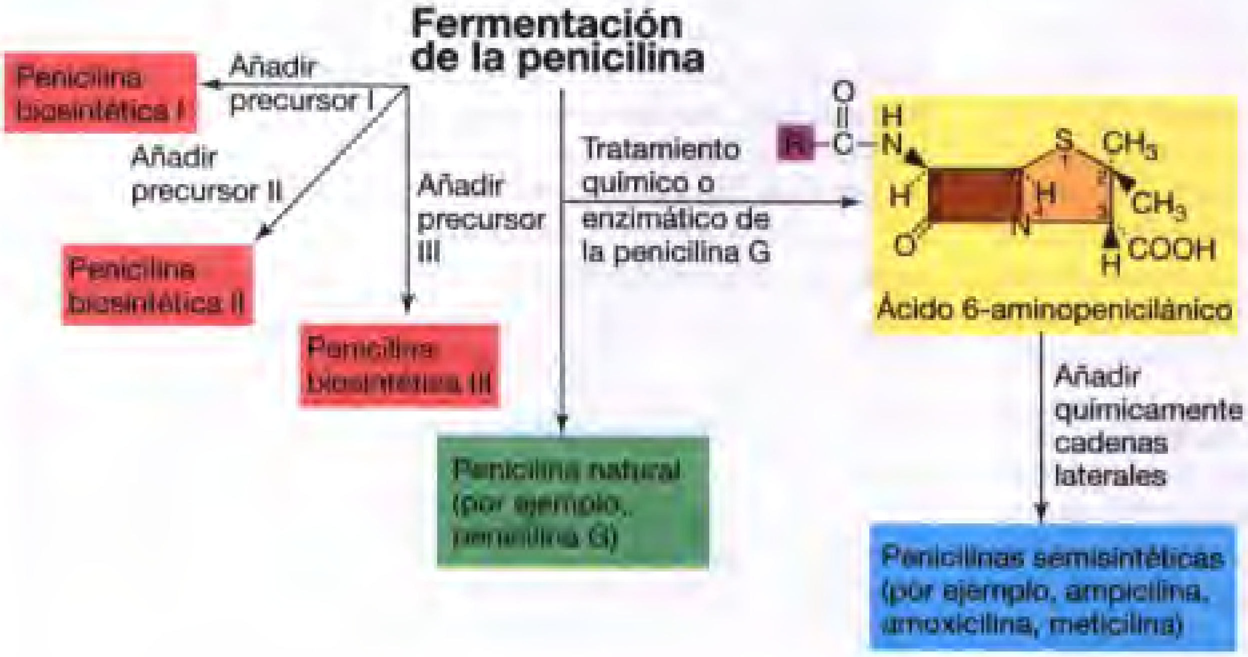

Fermentación de la penicilina
Penicilina biosintética I
Añadir precursor I
Añadir precursor II
Penicilina biosintética II
Añadir precursor III
Penicilina biosintética III
Penicilina natural (por ejemplo, penicilina G)
Tratamiento químico o enzimático de la penicilina G
R
O
C
H
N
S
CH3
CH3
H
H
N
O
H
COOH
Ácido 6-aminopenicilánico
Añadir químicamente cadenas laterales
Penicilinas semisintéticas (por ejemplo, ampicilina, amoxicilina, meticilina)

Figura 30.9 Producción industrial de penicilinas. El anillo de β-lactamo se muestra en color marrón oscuro. La fermentación normal conduce a la producción de penicilinas naturales. Si durante la fermentación se añaden precursores específicos, se forman algunas penicilinas biosintéticas. Las penicilinas semisintéticas se producen añadiendo por métodos químicos una cadena lateral específica al núcleo del ácido 6-aminopenicilánico al grupo «R», que se muestra en color morado. Las penicilinas semisintéticas son las que tienen la mayor utilidad clínica, puesto que por lo general son activas frente a las bacterias Gram negativas y pueden administrarse por vía oral.

posterior modificación por el químico orgánico, para producir la penicilina con propiedades clínicas específicas.

La estructura básica de todas las penicilinas es el *ácido 6-aminopenicilánico* (6-APA), que consiste en un anillo tiazolidínico condensado con un anillo β-lactámico (Figura 30.9). El 6-APA lleva una cadena variable en la posición 6. Si la síntesis de la penicilina se realiza sin la adición de precursores de la cadena lateral, se producen las **penicilinas naturales** (Figura 30.9). La fermentación también puede ser más específica, suplementando el medio de cultivo con los *precursores de la cadena lateral*, de modo que sólo se produzca la penicilina deseada. Los productos que se forman en estas condiciones se denominan **penicilinas biosintéticas** (Figura 30.9). Sin embargo, con el fin de producir las penicilinas más útiles, aquellas con actividad frente a bacterias Gram negativas, suele utilizarse una fermentación combinada con un procedimiento químico, lo cual conduce a la producción de **penicilinas semisintéticas**. En este caso, una penicilina natural producida microbiológicamente es escindida, química o enzimáticamente para dar 6-APA, y posteriormente modificada químicamente por adición de una cadena lateral (Figura 30.9). La penicilinas semisintéticas tienen muchas ventajas desde el punto de vista clínico, en terminos de su espectro de acción y del hecho de que muchas de ellas, por ejemplo, la ampicilina, pueden administrarse por via oral y, por tanto, no requieren una inyección. Por estas razones, las penicilinas semisintéticas representan las mayoría de las penicilinas comercializadas en la actualidad.

Métodos de producción de antibióticos β-lactámicos

La penicilina G se produce en fermentadores de 40 000 a 200 000 litros de capacidad. La producción de penicilina es un proceso aeróbico, por lo que se necesita una aireación muy eficiente. La penicilina es un metabolito secundario. Durante la fase de crecimiento, se produce muy poca penicilina, pero una vez que la fuente de carbono se ha consumido casi completamente, empieza la fase de producción de penicilina (Figura 30.10). Alimentando el fermentador con diversos componentes del medio de cultivo, la fase de producción de penicilina se puede alargar durante varios días (Figura 30.10).

Uno de los principales ingredientes en la mayoría de los medios de producción de penicilina es el **licor de maceración del maíz**. Esta sustancia costituye la fuente de nitrógeno y contiene otros factores de crecimiento. Generalmente, la fuente de carbono es la *lactosa* (Figura 30.10). La penicilina se excreta al medio, y una vez que las células se han separado del medio por filtración, se baja el pH del medio y se extrae el antibiótico con un disolvente orgánico. Después de concentrarse en el solvente, el antibiótico se vuelve a extraer en un medio acuoso a pH alcalino, posteriormente se concentra y se cristaliza. Rápidamente puede obtenerse penicilina altamente purificada con este método.

Otros antibióticos β-lactámicos

Se conocen diversos antibióticos β-lactámicos. Las *cefalosporinas* son antibióticos β-lactámicos que contienen dihidrotiazina en lugar del anillo tiazolidina (*véanse* Sección 20.8 y Figura 20.12). Las cefalosporinas fueron descubiertas inicialmente como productos del hongo *Cephalosporium acremonium*, pero otros hongos y algunos procariotas también producen antibióticos con este tipo de anillo. Además se producen diversas cefalosporinas semisintéticas. Las cefalosporinas tienen gran valor en clínica, no sólo por su baja toxicidad sino también por su *amplio espectro de acción* (*véase* Sección 20.8), y son útiles frente a muchas bacterias patógenas.

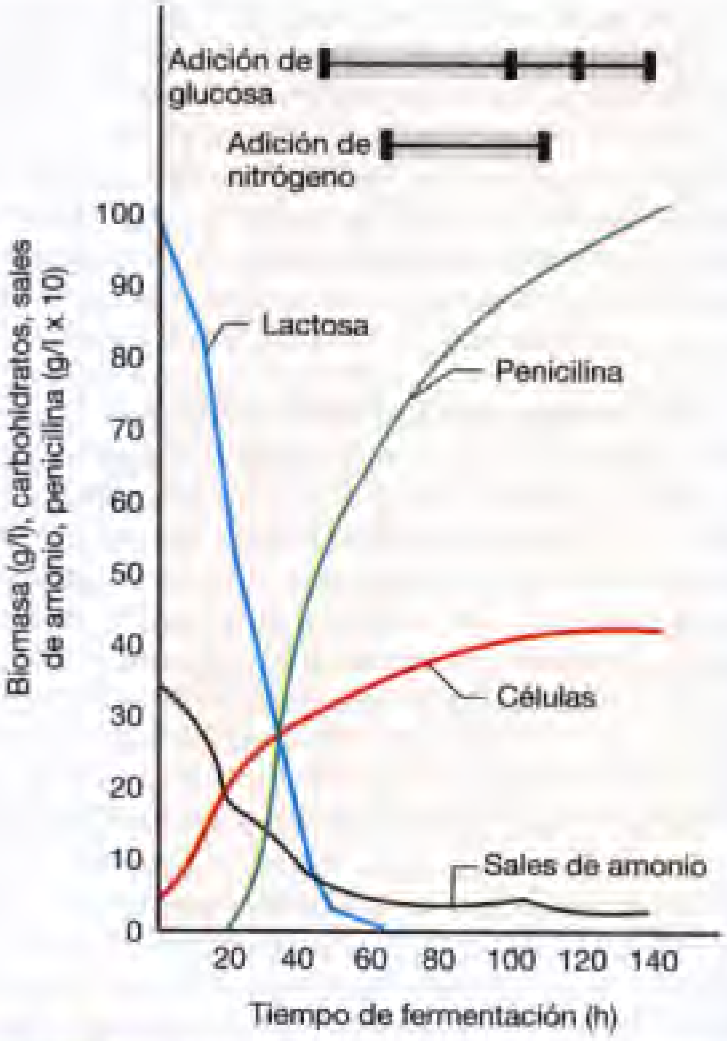


Figura 30.10 Cinética de la fermentación de la penicilina con *Penicillium chrysogenum*. Obsérvese que la producción de penicilina se produce cuando las células están entrando en la fase estacionaria, y la mayor parte del carbono y de nitrógeno se ha agotado. Reponer nutrientes hace que se mantenga alta la producción de penicilina.

Producción de tetraciclinas

La biosíntesis de una tetraciclina requiere un gran número de reacciones enzimáticas. En el caso de la clortetraciclina (Figura 30.11), pueden estar implicados hasta 72 productos intermediarios, la mayoría de los cuales sólo se conocen de forma general. Los estudios realizados sobre la genética de *Streptomyces aureofaciens*, la bacteria productora de la clortetraciclina, han mostrado que ¡están implicados más de 300 genes! Con tan elevado número de genes, la regulación de la biosíntesis de este antibiótico es muy compleja. No obstante, se conoce una serie de señales reguladoras y programas de producción que funcionan bien. Por ejemplo, se sabe que la glucosa y el fosfato reprimen la síntesis de la clortetraciclina. La represión por fosfato es especialmente significativa, y por ello el medio de cultivo usado en la producción comercial contiene una baja concentración de fosfato. En la Figura 30.11 se muestra un esquema de producción para la clortetraciclina. Como en la producción de penicilina, el licor de maceración del maíz se emplea en la producción a gran escala de la clortetraciclina, pero la fuente de

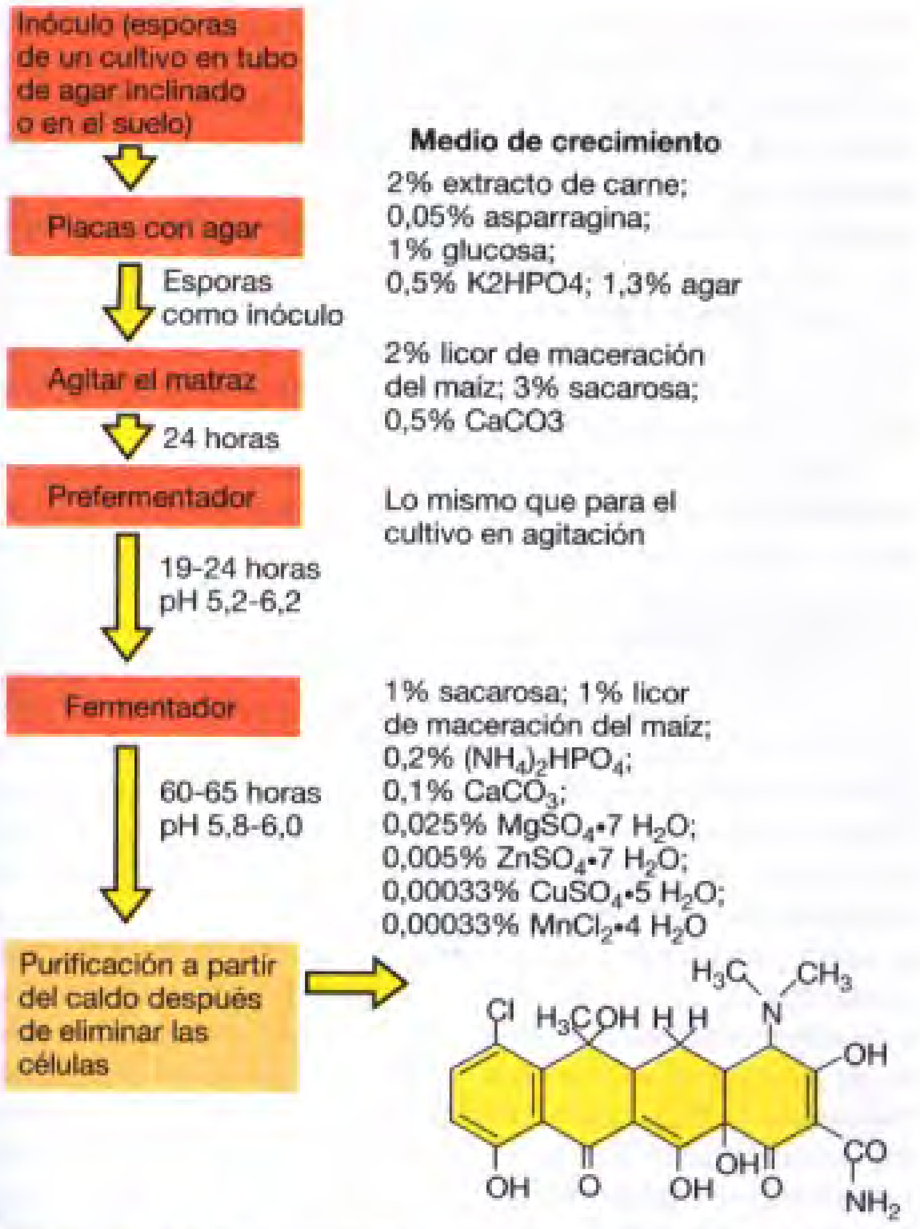

Inóculo (esporas de un cultivo en tubo de agar inclinado o en el suelo)
Medio de crecimiento
Placas con agar
2% extracto de carne; 0,05% asparragina; 1% glucosa; 0,5% K2HPO4; 1,3% agar
Esporas como inóculo
Agitar el matraz
2% licor de maceración del maíz; 3% sacarosa; 0,5% CaCO3
24 horas
Prefermentador
Lo mismo que para el cultivo en agitación
19-24 horas pH 5,2-6,2
Fermentador
1% sacarosa; 1% licor de maceración del maíz; 0,2% (NH4)2HPO4; 0,1% CaCO3; 0,025% MgSO4•7 H2O; 0,005% ZnSO4•7 H2O; 0,00033% CuSO4•5 H2O; 0,00033% MnCl2•4 H2O
60-65 horas pH 5,8-6,0
Purificación a partir del caldo después de eliminar las células

Figura 30.11 Esquema de la producción de clorotetraciclina con *Streptomyces aureofaciens*. La estructura de la clorotetraciclina se muestra abajo a la derecha. Temperatura de crecimiento: 28°C en todo el proceso.

carbono, en este caso, es la sacarosa (no la lactosa). Se evita la glucosa porque causa una represión por catabolito en la producción de antibiótico (*véase* Sección 8.7).

✓ 30.6 Revisión de conceptos

Los principales antibióticos con importancia en clínica son los antibióticos β-lactámicos penicilinas y cefalosporinas, y las tetraciclinas. Todos ellos son metabolitos secundarios y se producen industrialmente con buenos rendimientos, a pesar de que la bioquímica de su biosíntesis y su genética se conocen parcialmente.

- ✓ ¿Cuál es la estructura común de la penicilina y la cefalosporina?
- ✓ En términos de producción de penicilina, ¿qué significa el término *semisintético*? ¿Y *biosintético*?

30.7 Vitaminas y aminoácidos

La vitaminas y los aminoácidos son factores de crecimiento que frecuentemente se usan con fines farmacológicos o se añaden a los alimentos. Varias vitaminas importantes y aminoácidos se producen comercialmente por procesos biocatalíticos.

Vitaminas

La vitaminas se usan como suplementos para la alimentación humana y en piensos animales, y la producción de vitaminas sigue en importancia a la de los antibióticos sólo en términos de ventas totales de productos farmacéuticos. La mayoría de las vitaminas se obtienen comercialmente por síntesis química. Sin embargo, algunas son demasiado complicadas para sintetizarlas a bajo costo, pero pueden obtenerse por biocatálisis. La vitamina B_{12} y la riboflavina son las más importantes dentro de este tipo de vitaminas.

La **vitamina B_{12}** (Figura 30.12*a*) se sintetiza en la naturaleza casi exclusivamente por los micoorganismos. Como coenzima, la vitamina B_{12} desempeña una función importante en la bioquímica de los animales, participando en va-

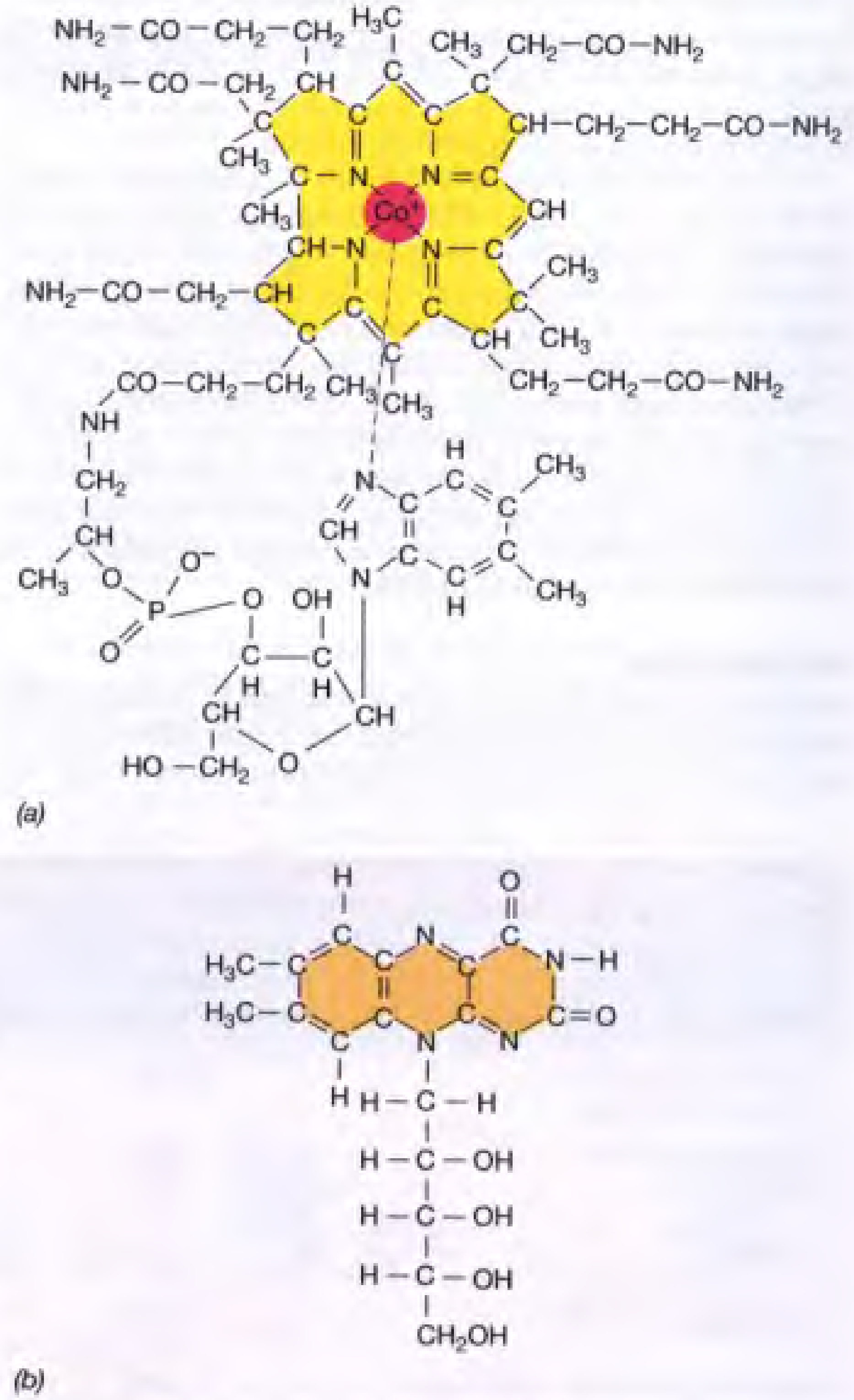


Figura 30.12 Vitaminas producidas por microorganismos a escala industrial. (a) Vitamina B_{12}. Se muestra la estructura de la cobalamina; obsérvese el átomo central de cobalto. La forma coenzima de la vitamina B_{12} contiene un grupo desoxiadenosilo unido al Co por encima del plano del anillo. (b) Riboflavina (vitamina B_2) (*véanse* Sección 5.11 y Figura 5.15).

rios reagrupamientos intramoleculares en los que un átomo de hidrógeno en un carbono y un sustituyente en el carbono adyacente se intercambian. En el hombre, una deficiencia importante de vitamina B_{12} produce la llamada *anemia perniciosa*, que se caracteriza por la baja producción de eritrocitos (glóbulos rojos) y alteraciones en el sistema nervioso. Los requerimientos de vitamina B_{12} por los animales se satisfacen con la dieta o por absorción de la vitamina producida en el intestino de los animales por los microorganismos intestinales. Las plantas ni producen ni utilizan la vitamina B_{12}.

Para la producción industrial de la vitamina B_{12}, se usan las cepas microbianas que se han seleccionado específicamente por su alto rendimiento en la producción de esa vitamina. Especies bacterianas del género *Propionibacterium* y *Pseudomonas* son las principales productoras comerciales. El cobalto es un importante componente de la estructura de la vitamina B12 (Figura 30.12*a*), y el rendimiento en la producción de la vitamina se incrementa mucho mediante la adición de cobalto al medio de cultivo.

La **riboflavina** (Figura 30.12*b*) es el compuesto parental de las flavinas, FAD y FMN, coenzimas que tienen importantes funciones en las enzimas implicadas en las reacciones de oxidación-reducción en casi todos los organismos (*véase* Sección 5.11). La riboblavina es sintetizada por muchos microoganismos, como bacterias, levaduras y hongos. El hongo *Ashbya gossypii* produce, de forma natural, enormes cantidades de esta vitamina (hasta 7g/l) y por ello se usa para la mayoría de los procesos de producción microbiana. A pesar de este rendimiento excelente, hay una gran competencia económica entre este proceso microbiológico y la síntesis estrictamente química.

Aminoácidos

Los aminoácidos tienen muchos usos en la industria alimentaria, como aditivos alimentarios, como aditivos en la alimentación, en medicina, y como precursores en la industria química (Tabla 30.3). El aminoácido comercial más importante es el **ácido glutámico**, que se utiliza para aumentar el sabor [glutamato monosódico (MSG)]. Otros dos aminoácidos importantes son el **ácido aspártico** y la **fenilalanina**, que son los ingredientes del edulcorante artificial **aspartamo**, un importante ingrediente en las bebidas bajas en calorías y otros productos sin azúcar. La **lisina**, un aminoácido esencial para el hombre y algunos animales de granja, se produce comercialmente a partir de la bacteria *Brevibacterium flavum*, para utilizarse como aditivo alimentario; aquí nos centraremos en este último.

Dado que los microorganismos utilizan los aminoácidos como unidades fundamentales para sintetizar proteínas, su síntesis sigue una regulación celular estricta (*véase* Capítulo 8). Sin embargo, para producir industrialmente un aminoácido, es necesario evitar estos mecanismos reguladores a fin de obtener una cepa que sobreexprese dicho aminoácido y sea capaz de producirlo de forma económica. La producción de lisina por *Brevibacterium flavum* se controla bioquímicamente a nivel de la enzima aspartoquinasa, en la que el exceso de lisina retroinhíbe la actividad de esta enzima (Figura 30.13*a*) (el fenomeno general de la inhibición retroalimentada se describió en al Sección 8.2). Sin embargo, la sobreproducción de la lisina puede obtenerse aislando mutantes de *B. flavum* en los que la aspartoquinasa ya no esté sujeta a retroinhibición. Esto se logra con el aislamiento de mutantes resitentes al análogo de la lisina S-aminoetilcisteína (AEC), que se une al sitio alostérico de la aspartokinasa e inhibe la actividad de la enzima (Figura 30.13*b*). Los mutantes resistentes a la AEC, que se obtienen fácilmente por selección positiva, producen una forma modificada de la aspartokinasa con un sitio alostérico que ya no reconoce a la AEC *o* a la lisina, por lo que la retroinhibición por lisina está muy reducida. Dichos mutantes de *B. flavum* pueden producir hasta 60 g de lisina por litro en fermentadores industriales, una concentración lo suficientemente elevada como para que el proceso sea viable.

TABLA 30.3 Aminoácidos utilizados en la industria alimentaria[a]

Aminoácido[b]	Producción anual del mundo (toneladas métricas)	Usos	Finalidad
L-glutamato (glutamato monosódico, MSG)	370 000	Diversos alimentos	Reforzar el sabor; ablandador de la carne
L-aspartato y alanina	5000	Zumos de fruta	Enriquecer el sabor
Glicina	6000	Alimentos edulcorados	Mejorar el sabor, punto de partida para síntesis orgánicas
L-cisteína	700	Pan	Mejorar la calidad
		Zumos de fruta	Antioxidante
L-triptófano + L-histidina	400	Varios alimentos, leche en polvo	Antioxidante, evitar el enranciado; aditivo nutritivo
Aspartamo (fabricado a partir de la L-fenilalanina + L-ácido aspártico)	7000	Bebidas refrescantes	Edulcorante bajo en calorías
L-lisina	70 000	Pan (Japón), aditivos para piensos	Aditivo nutritivo
DL-metionina	70 000	Productos de la soja, aditivos para piensos	Aditivo nutritivo

[a] Datos tomados de Glazer, A. N., y Mikaido, H., 1995. *Microbiological Biotechnology*. W. H. Freeman, New York.

[b] La estructura de estos aminoácidos se muestra en la Figura 3.12.

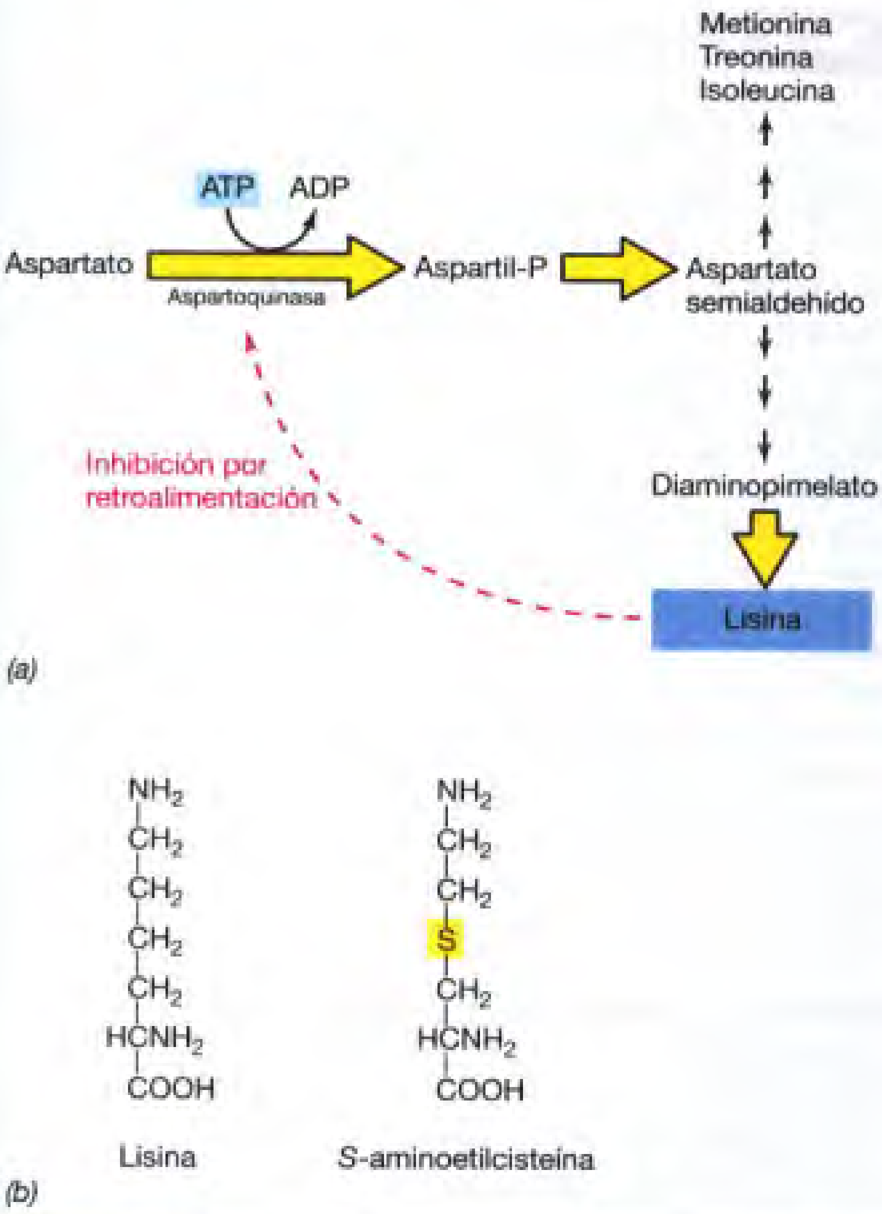

Metionina
Treonina
Isoleucina
ATP
ADP
Aspartato
Aspartoquinasa
Aspartil-P
Aspartato semialdehído
Diaminopimelato
Lisina
Inhibición por retroalimentación
(a)
NH2
CH2
CH2
CH2
CH2
HCNH2
COOH
Lisina
NH2
CH2
CH2
S
CH2
HCNH2
COOH
S-aminoetilcisteína
(b)

Figura 30.13 Producción industrial de lisina utilizando *Brevibacterium flavum*. (a) Vía bioquímica que conduce desde el aspartato a la lisina; obsérvese que la lisina puede inhibir por retroalimentación (*véase* Sección 8.2) la actividad de la enzima aspartoquinasa, lo que hará que cese la producción de lisina. (b) Estructura de la lisina y del análogo de la lisina S-aminoetilcisteína (AEC). La AEC inhibe normalmente el crecimiento, pero los mutantes de *B. flavum* resistentes a la AEC poseen un sitio alosférico alterado en su aspartoquinasa, y crecen y superproducen lisina, porque ya no tiene lugar la inhibición por retroalimentación.

✓ 30.7 Revisión de conceptos

La vitaminas producidas microbiológicamente son la vitamina B_{12} y la riboflavina, mientras que los aminoácidos más importantes que se producen comercialmente son el ácido glutámico, el ácido aspártico, la fenilalanina y la lisina. Se obtienen rendimientos elevados de aminoácidos modificando las señales que regulan la síntesis del aminoácido en particular, de modo que se sobreexprese.

- ✓ ¿Cuál es el aminoácido que se produce comercialmente en mayores cantidades?
- ✓ ¿Cómo se puede incrementar el rendimiento en la producción de un aminoácido evitando la inhibición retroalimentada?

30.8 Bioconversión microbiana

Los microorganismos pueden utilizarse para biocatalizar reacciones químicas específicas más allá de la química orgánica. La utilización de microorganismos con este propósito se denomina **bioconversión** o **biotransformación**, e implica el cultivo del microorganismo en fermentadores grandes, seguido de la adición del compuesto químico que ha de ser «convertido», en el momento adecuado. Después de un periodo de incubación, durante el que el microorganismo actúa sobre el compuesto químico, se extrae el caldo de fermentación y se purifica el producto que se desee. Aunque en principio la bioconversión puede usarse para varios procesos, su principal utilización industrial ha sido la producción de algunas hormonas esteroideas (Figura 30.14).

Ya comentamos la función de los esteroles en las membranas eucarióticas en la Sección 4.5. Los esteroides, que derivan de los esteroles, son importantes hormonas en animales que regulan varios procesos metabólicos. Algunos esteroides también se usan en medicina humana. Los miembros del grupo de los *esteroides adrenocorticoides* reducen la inflamación y, por tanto, son eficaces para controlar los síntomas de la artritis y la alergia. Los miembros de otro grupo de esteroides, los estrógenos y andrógenos, están implicados en la fertilidad humana y algunos de ellos pueden usarse para controlar la fertilidad. Los esteroides pueden obtenerse completamente por síntesis química, pero es un

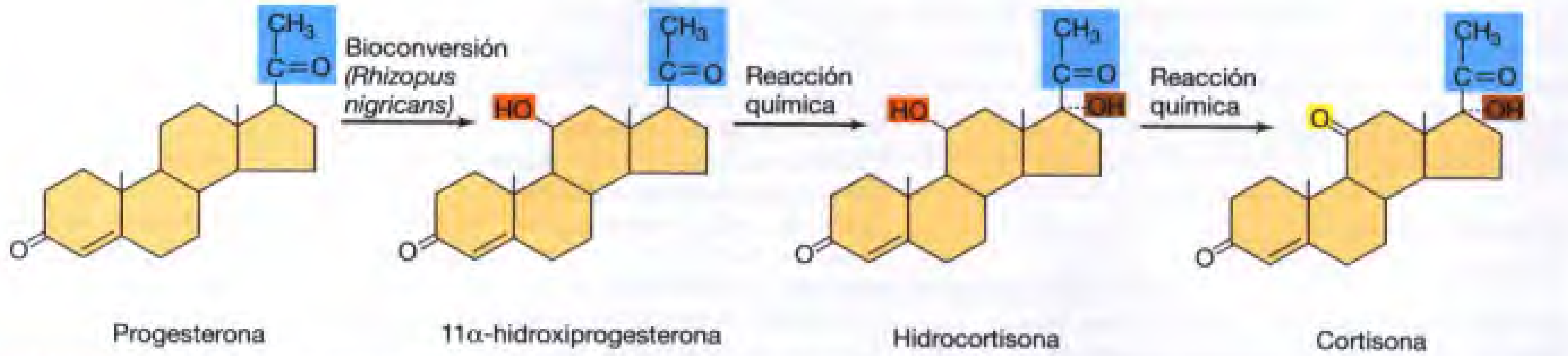

CH3
C=O
Bioconversión
(Rhizopus nigricans)
HO
Reacción química
OH
O
Progesterona
11α-hidroxiprogesterona
Hidrocortisona
Cortisona

Figura 30.14 Producción de cortisona utilizando un microorganismo. La primera reacción es una bioconversión microbiana típica, a saber, la formación de 11α-hidroxiprogesterona a partir de progesterona. Esta oxidación altamente específica, realizada por el hongo *Rhizopus nigricans*, omite una difícil síntesis química. Todos los demás pasos, desde la progesterona hasta la hormona esteroidea cortisona, se realizan químicamente.

proceso complicado y caro. Algunas etapas clave en la síntesis química pueden realizarse de froma más eficaz mediante microorganismos, y en la producción comercial de los esteroides, al menos una de las etapas de síntesis es microbiana.

Cortisona e hidorcortisona

En la producción de la hidrocortisona y la cortisona, los esteroides se usan para reducir la hinchazón y el picor de irritaciones menores epidérmicas, el hongo *Rhizopus nigricans* realiza una bioconversión clave, la hidroxilación estereoespecífica de un precursor de la cortisona (Figura 30.14). La mayoría de las bioconversiones esteroideas conllevan hidroxilaciones de este tipo, e industrialmente se usan diferentes hongos para llevar a cabo una u otra hidroxilación específica. Actualmente, la producción de esteroides es un gran negocio, según indican las cifras de venta alcanzadas para los cuatro esteroides principales: hidrocortisona, cortisona, prednisona y prednisolona, cifras estimadas en unas 800 toneladas/año.

✓ 30.8 Revisión de conceptos

La bioconversión microbiana utiliza microorganismos para biocatalizar una etapa específica o varias etapas, en una síntesis estrictamente química.

- ✓ Ponga un ejemplo de una bioconversión microbiana. ¿Por qué se necesita la bioconversión?
- ✓ Describa dos formas en las que una bioconversión difiera de una fermentación típica, como la producción de antibióticos.

30.9 Enzimas

Cada organismo produce una gran variedad de enzimas, muchas de las cuales sólo se sintetizan en pequeña cantidad y están implicadas en procesos celulares (*véase* Sección 5.5). No obstante, algunas enzimas se producen en cantidades mucho más grandes por algunos organismos y, en vez de quedarse en el interior de la célula, se excretan al medio de cultivo. Las *enzimas extracelulares* (exoenzimas) son capaces de digerir polímeros insolubles como la celulosa, las proteínas y el almidón; posteriormente, los productos de digestión son transportados al interior de las células donde se utilizan como nutrientes para el crecimiento. Algunas de estas exoenzimas se utilizan en las industrias alimentaria, láctica, farmacéutica y textil, y se producen en grandes cantidades por síntesis microbiana (Tabla 30.4). Las enzimas son biocatalizadores especialmente útiles porque a menudo actúan en grupos funcionales químicos que son únicos, distinguen fácilmente entre gurpos funcionales similares en una misma molécula y, en muchos casos, catalizan reacciones de forma estereoespecífica, produciendo sólo uno de los dos posibles enantiómeros (por ejemplo, el enantiómero-D de un azúcar, o un L-aminoácido; *véase* Sección 3.6).

Proteasas, amilasas y jarabes ricos en fructosa

Tanto los hongos como las bacterias producen enzimas. Las enzimas micorbianas producidas en mayores cantidades, desde el punto de vista industrial, son las proteasas, que se usan como aditivos en los detergentes para lavar la ropa. La mayoría de los detergentes para lavar la ropa actuales con-

TABLA 30.4 Enzimas microbianas y sus aplicaciones

Enzima	Fuente	Aplicación	Industria
Amilasa (digiere el almidón)	Hongos	Pan	Panadera
	Bacterias	Revestimientos de almidón	Papelera
	Hongos	Fabricación de jarabe y glucosa	Alimentaria
	Bacterias	Almidonado en frío de la ropa	Almidón
	Hongos	Ayuda digestiva	Farmacéutica
	Bacterias	Eliminación de revestimientos	Textil
	Bacterias	Eliminación de manchas, detergentes	Lavandería
Proteasa (digiere las proteínas)	Hongos	Pan	Panadera
	Bacterias	Eliminación de manchas	Limpieza en seco
	Bacterias	Ablandador de la carne	Cárnica
	Bacterias	Limpieza de las heridas	Medicina
	Bacterias	Eliminación de revestimientos	Textil
	Bacterias	Detergentes domésticos	Lavandería
Invertasa (digiere la sacarosa)	Levadura	Relleno blando de caramelos	Confitería
Glucosa oxidasa	Hongos	Eliminación de glucosa, eliminación de oxígeno	Alimentaria
		Papeles para pruebas de diabetes	Farmacéutica
Glucosa isomerasa	Bacterias	Jarabe de cereales rico en glucosa	Bebidas refrescantes
Pectinasa	Hongos	Prensado, clarificación	Zumos de frutas
Renina	Hongos	Coagulación de la leche	Quesera
Celulasa	Bacterias	Suavizante y abrillantador de tejidos, detergentes	Lavandería
Lipasa	Hongos	Degradación de la grasa	Lechera, lavandería
Lactasa	Hongos	Degradación de la lactosa a glucosa y galactosa	Lechera, alimentaria
DNA polimerasa	Bacterias *Archaea*	Replicación del DNA en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); (*véase* Sección 10.17)	Investigación biológica, forense

tiene enzimas, principalmente proteasas, pero también amilasas, lipasas, reductasas y otras. Muchas de estas enzimas se aíslan de bacterias alcalófilas (*véase* Sección 6.11), sobre todo de especies del género *Bacillus*, como *Bacillus licheniformis* (Tabla 30.4). Estas enzimas que tienen un pH óptimo entre 9 y 10, permanecen activas al pH alcalino de las soluciones de los detergentes.

Otras enzimas importantes fabricadas comercialmente son las amilasas y glucoamilasas, que se emplean en la producción de glucosa a partir del almidón. La glucosa así producida puede entonces converitrse en fructosa (que es más dulce que la glucosa y la sacarosa) por acción de la enzima glucosa isomerasa, lo que da como resultado la producción final de un edulcorante rico en fructosa a partir del maíz, trigo o almidón de patata. En la industria alimentaria este proceso es muy importante y un gran negocio, sobre todo en la producción de bebidas no alcohólicas.

Extremoenzimas: enzimas de procariotas que viven en ambientes extremos

En los Capítulos 2 y 6 consideramos los aspectos del crecimento microbiano a elevadas temperaturas y descubrimos cómo algunos procariotas, llamados *hipertermófilos*, crecen óptimamente a temperaturas muy altas e incluso, en algunos casos, a temperaturas superiores a las de ebullición del agua. Los hipertermófilos crecen a esas temperaturas tan elevadas porque porducen macromoléculas termoestables (*véase* Sección 6.10), por ejemplo: enzimas como las que se resumen en la Tabla 30.4 peor que funcionan a temperaturas muy altas (Figura 30.15*b*). El término **extremoenzimas** se refiere a enzimas que funcionan a temperaturas extremadamente altas (o enzimas que funcionan de forma óptima *en cualquier* ambiente extremo; por ejemplo, en el frío, con altas concentraciones de sal, o a pH muy ácidos o muy alcalinos [Figura 30.15*a*]). Los organismos que producen extremoenzimas se denominan **extremófilos** (*véase* Tabla 2.1) para indicar que crecen en condiciones que no son viables para la mayoría de los microorganismos.

Debido a que muchos procesos industriales operan mejor a temperaturas elevadas, las extremoenzimas de los hipertermófilos están siendo uitlizadas, cada vez más, como biocatalizadores en las aplicaciones industiales que se recogen en la Tabla 30.4 y también en muchas técnicas en la investigación que requieren enzimas. Además de la *Taq* y la *Pfu* polimerasas para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita en la Seccion 10.17, se han aislado y caracterizado proteasas, amilasas, celulasas, pululanasas (Figura 30.15*b*) y xilanasas extremadamente termoestables de varios hipertermófilos. Dichos biocatalizadores termorresitentes y extremoenzimas crioactivas —activas en frío— (de psicrófilos), activas en presencia de altas concentraciones de sal (de halófilos), o activas a pH alto o bajo (de alcalófilos y acidófilos, respectivamente), sin ningún género de duda serán cada vez más utilizados en la industria, en situaciones en las que se requiera una acitvidad biocatalítica en condiciones extremas. Por tanto, la gran especificidad de las enzimas y su capacidad para distinguir enre isómeros quirales hacen que aquéllas que funcionan en ambientes extremos, sean particularmente importantes para la industria química.

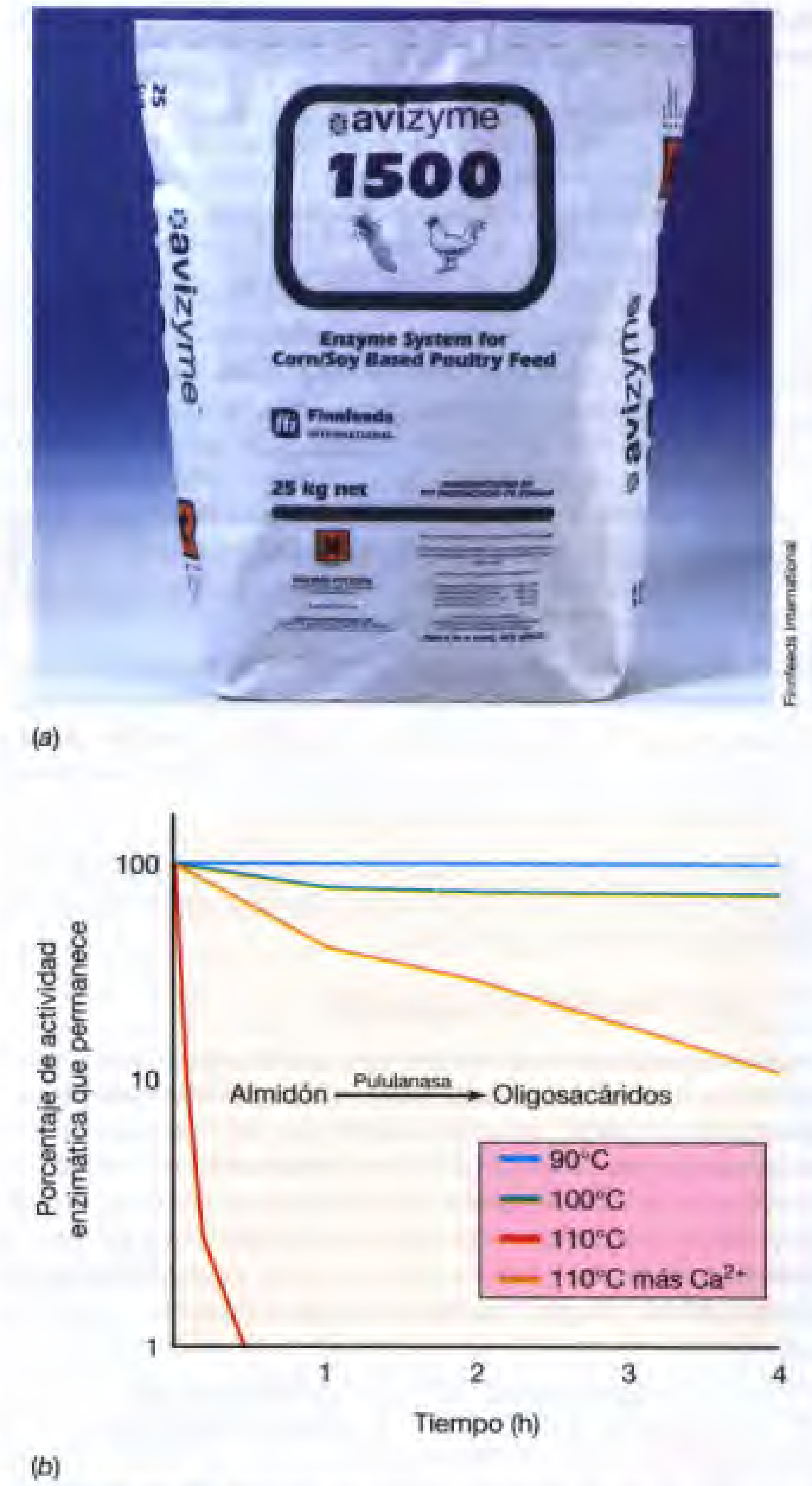


Figura 30.15 Ejemplos de extremoenzimas, enzimas que funcionan en condiciones medioambientales extremas. (a) Enzimas tolerantes a ácidos. Una mezcla de enzimas utilizada como suplemento alimenticio para las aves. Las enzimas funcionan en el estómago del pájaro para digerir materiales fibrosos del alimento, lo que mejora el valor nutricional de este último y favorece un rápido crecimiento del animal. (b) Enzimas termoestables. Termoestabilidad de la enzima pululanasa procedente de *Pyrococcus woesei*, una enzima hipertermófila cuya temperatura de crecimiento óptima es de 100°C (*véase* Sección 13.9). El calcio mejora la estabilidad térmica de esta enzima.

Enzimas inmovilizadas

En algunos procesos biocatalíticos se desea convertir enzimas solubles en enzimas inmovilizadas. La inmovilización no sólo facilita la reacción enzimática en condiciones de producción contínua a gran escala, sino que también contribuye a la estabilización de las enzimas evitando su desnaturalización. Existen tres aproximaciones básicas para la inmovilización de enzimas (Figura 30.16):

1. **Unión** de la enzima a un soporte. La unión puede ser por adsorción, enlace iónico o enlace covalente. Los soportes usados son celulosas modificadas, carbón activado, arcillas minerales, óxido de aluminio y bolitas de vidrio (Figura 30.16).
2. **Polimerización (entrecruzamiento, *cross-linkage*)** de las moléculas de enzimas. La unión de las moléculas enzimáticas unas con otras se realiza habitulamente por reacción química con un agente polimerizante como el glutaraldehído. La polimerización de las enzimas implica la reacción química de los grupos amino de la proteína enzimatica con el glutaraldehído. Si la reacción se realiza de forma adecuada, las moléculas enzimáticas pueden unirse de tal manera que se mantenga la mayor parte de la actividad enzimática.
3. **Inclusión enzimática**, que supone la inclusión de la enzima en una *membrana semipermeable*. Las enzimas pueden encerrarse en microcápsulas, geles, membranas semipermeables de polímeros o polímeros fibrosos como el acetato de celulosa (Figura 30.16).

Cada uno de estos métodos tiene ventajas y desventajas, y el procedimiento utilizado depende de la enzima y de la aplicación industrial particular.

✓ 30.9 Revisión de conceptos

Los microorganismos son ideales para producir enzimas a gran escala. Muchas enzimas se usan en la industria de lavado (detergentes) para eliminar manchas de la ropa, y las enzimas estables a altas temperaturas y a pH alcalinos tienen muchas ventajas en estos mercados. Las enzimas procedentes de los extremófilos son muy útiles como biocatalizadores en condiciones extremas. Cuando una enzima se usa en un proceso a gran escala, puede ser conveniente inmovilizarla en un sustrato inerte.

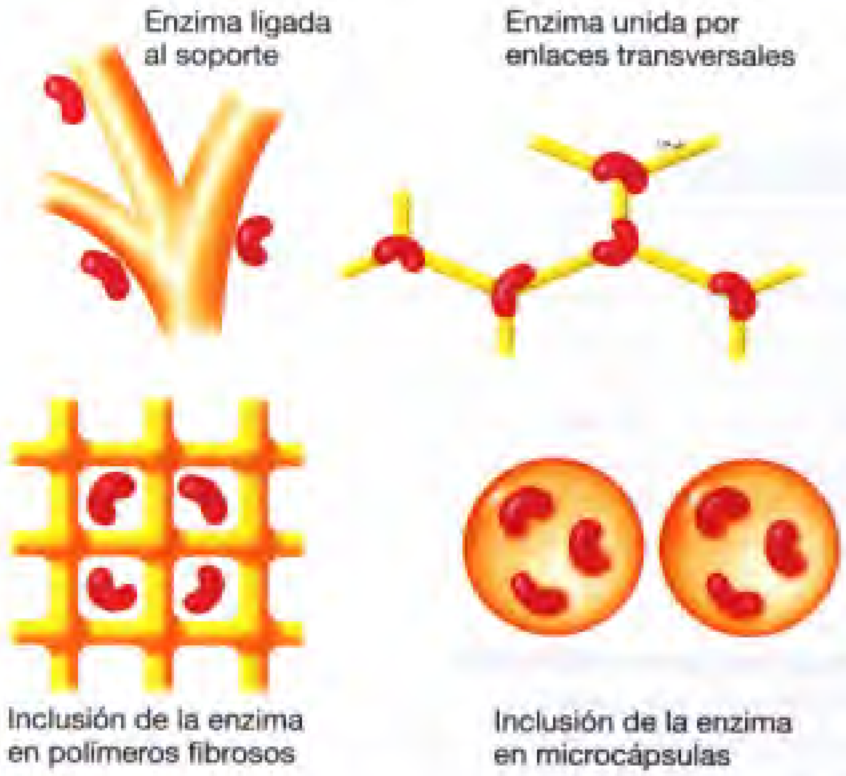

Enzima ligada al soporte
Enzima unida por enlaces transversales
Inclusión de la enzima en polímeros fibrosos
Inclusión de la enzima en microcápsulas

Figura 30.16 Procedimientos para la inmovilización de las enzimas. En todos los casos las moléculas enzimáticas se muestran en rojo.

- ✓ ¿Cómo se utilizan las enzimas en la industria de los detergentes?
- ✓ Resuma las etapas enzimáticas que conducen a la producción de jarabes ricos en fructosa, para la elaboración de bebidas no alcohólicas.
- ✓ ¿Qué es una *extemoenzima*?

30.10 Vinagre

El vinagre es el producto resultante de la conversión del alcohol etílico en ácido acético por la acción de las **bacterias del ácido acético**, que son miembros de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*. El vinagre puede producirse a partir de cualquier sustancia que contenga etanol, aunque el material de partida habitual es el vino, la cerveza o el zumo alcohólico de manzana (la sidra). El vinagre también puede producirse a partir de una mezcla de alcohol puro en agua. En este caso recibe el nombre de *vinagre destilado*, en donde el término *destilado* se refiere más al alcohol del que se fabrica el producto que al vinagre en sí mismo. El vinagre se utiliza como ingrediente aromatizante para ensaladas y otros alimentos, así como para el encurtido de ciertas carnes y las hortalizas que, de este modo (si el proceso se ha llevado a cabo de forma adecuada) se pueden almacenar sin refrigeración durante años.

Las bacterias del ácido acético representan un grupo interesante de procariotas (*véase* Sección 12.8). Se trata de bacterias estrictamente aerobias que se diferencian de la mayor parte de otros microorganismos aerobios en el hecho de que algunas de ellas, como la especie *Gluconobacter*, no oxidan completamente sus donadores de electrones orgánicos hasta CO_2 y agua (*véase* Figura 30.17). De esta manera, cuando disponen de alcohol etílico como donador de electrones, lo oxidan a través de quinonas sólo hasta ácido acético, que se acumula en el medio. Las bacterias del ácido acético son muy tolerantes a los ácidos, por lo que no se destruyen mediante la acidez que producen. En todo caso, existe una alta demanda de oxígeno durante el crecimiento, por lo que el problema principal en la producción de vinagre consiste en garantizar una aireación suficiente del medio.

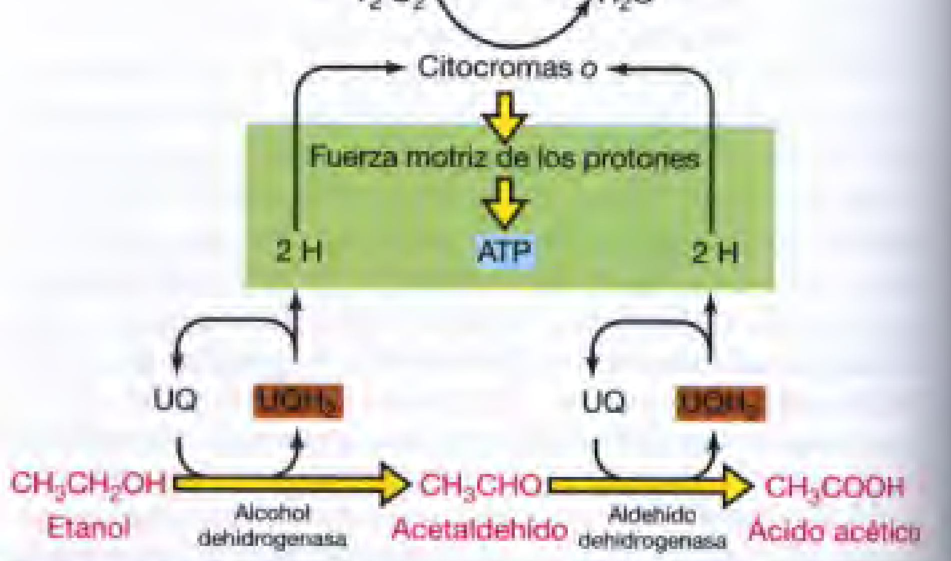


Figura 30.17 Oxidación del etanol a ácido acético, el proceso clave en la producción de vinagre; UQ = ubiquinona.

Producción de vinagre

Existen tres procesos diferentes para la producción de vinagre. El método de la **tinaja abierta** o **método de Orleáns** fue el proceso original y todavía se utiliza en Francia, país en el que se desarrolló. El vino se coloca en tinajas planas con una exposición considerable al aire y las bacterias de ácido acético se desarrollan como una capa mucilaginosa sobre la superficie del líquido. Este proceso no es muy eficaz, puesto que el único lugar en el que las bacterias entran en contacto al mismo tiempo con el aire y con el sustrato es en la superficie. El segundo proceso es el llamado **método de goteo (vinagre rápido)**, en el que el contacto entre las bacterias, el aire y el sustrato se consigue haciendo gotear el líquido alcohólico sobre leña fina de haya o sobre virutas de madera de haya apiladas en una tinaja o columna, al tiempo que una corriente de aire entra por el fondo y fluye hacia arriba. Las bacterias crecen sobre la superficie de las virutas de madera, por lo que quedan expuestas al máximo tanto al aire como al líquido. La tinaja se denomina *generador de vinagre* (*véase* Figura 30.18) y todo el proceso se desarrolla de una forma continua. La vida útil de las virutas de madera en un generador de vinagre es muy larga, y oscila entre 5 y 30 años, dependiendo de la clase de líquido alcohólico que se haya utilizado en el proceso

El tercer proceso para obtener vinagre es el **método del burbujeo**, que consiste básicamente en una fermentación sumergida como la que describimos en el caso de la producción de antibióticos. Al haber una aireación adecuada, la eficacia del método del burbujeo es alta, por lo que entre el 90% y el 98% del alcohol se convierte en ácido.

Aunque el ácido acético puede fabricarse fácilmente por métodos químicos a partir del alcohol, el producto microbiano, a saber, el *vinagre*, es un producto único cuyo aroma se debe en parte a otras sustancias presentes en el material de partida o a las que se producen en la fermentación. Por esta razón, el proceso microbiano, sobre todo si utiliza el generador de vinagre, no ha podido sustituirse aún por ningún proceso químico.

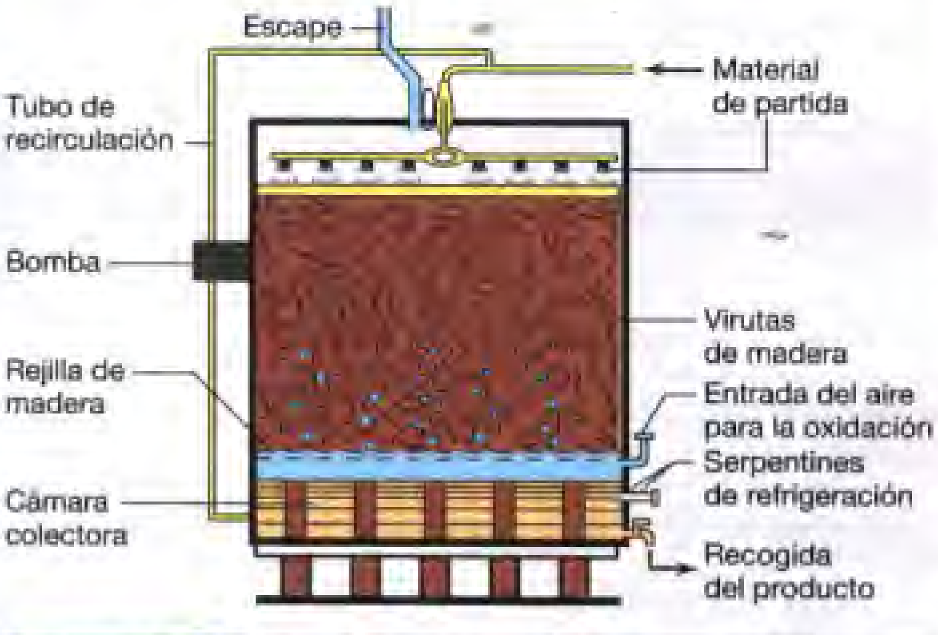


Figura 30.18 Diagrama de un generador de vinagre. El líquido alcohólico se hace gotear a través de virutas de madera y se deja que el aire pase desde el fondo hacia arriba y a través de las virutas. Las bacterias del ácido acético se desarrollan sobre las virutas de madera y convierten el alcohol en ácido acético. La solución de ácido acético se acumula en una cámara colectora y se recicla a través del generador hasta que se alcanza un contenido en ácido acético de al menos el 4%, la cantidad mínima de este compuesto que debe tener un producto para ser considerado «vinagre».

✓ 30.10 Revisión de conceptos

El ingrediente activo del vinagre es el ácido acético, que se produce a partir de una bacteria del ácido acético que oxida un zumo de fruta que contiene alcohol. La aireación adecuada es el factor más importante para garantizar una producción correcta de vinagre.

- ✓ ¿Por qué se necesita oxígeno para producir vinagre?
- ✓ ¿Por qué el vinagre que se produce mediante el método de goteo tiene un sabor distinto al del vinagre producido por el método de burbujeo?

30.11 Ácido cítrico y otros compuestos orgánicos

Muchos productos químicos orgánicos se producen a partir de microorganismos con un rendimiento suficiente para poder fabricarse comercialmente mediante fermentación. Por ejemplo, el *ácido cítrico*, que se utiliza ampliamente en alimentos y bebidas, el *ácido itacónico*, que se utiliza en la fabricación de resinas acrílicas, y el *ácido glucónico*, que se utiliza en los seres humanos en forma de gluconato cálcico para tratar deficiencias de calcio e, industrialmente, como agente de lavado y suavizante, se producen a partir de hongos. Por su parte, la *sorbosa*, que se produce cuando *Acetobacter* oxida el sorbitol, se utiliza para la fabricación de *ácido ascórbico* (vitamina C), y el *ácido láctico*, que se utiliza en la industria alimentaria para aumentar la acidez de alimentos y bebidas, se produce a partir de las bacterias del ácido láctico (*véase* Sección 12.19). En este caso nos concentraremos en la formación de ácido cítrico.

Ácido cítrico

El ácido cítrico se produce microbiológicamente por fermentación utilizando el hongo *Aspergillus niger*. Aunque generalmente se considera al ácido cítrico en conexión con el ciclo del ácido cítrico (*véase* Sección 5.13), en algunos microorganismos, como *A. niger*, se puede obtener la excreción de grandes cantidades de ácido cítrico. La fermentación se realiza por métodos aerobios en grandes fermentadores. La condición fundamental para tener un gran rendimiento de ácido cítrico es que el medio sea *deficiente en hierro*, puesto que el hongo superproduce ácido cítrico como agente quelante para apoderarse del hierro (*véase* Figura 30.19a). En consecuencia, el medio utilizado para la producción de ácido cítrico se somete a un tratamiento en el que se elimina la mayor parte del hierro, mientras que los fermentadores son de acero inoxidable para impedir que se filtre desde ellos el hierro que se produce debido a los bajos valores de pH que surgen con la acumulación de ácido cítrico. El medio utilizado para la producción del ácido cítrico contiene cualquier variedad de materiales de partida, entre los que cabe citar almidón de patata, hidrolizados de almidón, jarabe de glucosa procedente de almidón sacarificado, sacarosa (*véase* Figura 30.19a), jarabe de caña de azúcar, melazas de caña de azúcar y melazas de remolacha azucarera. Si se utiliza almidón, las amilasas (*véase* Tabla 30.4) que son formadas por

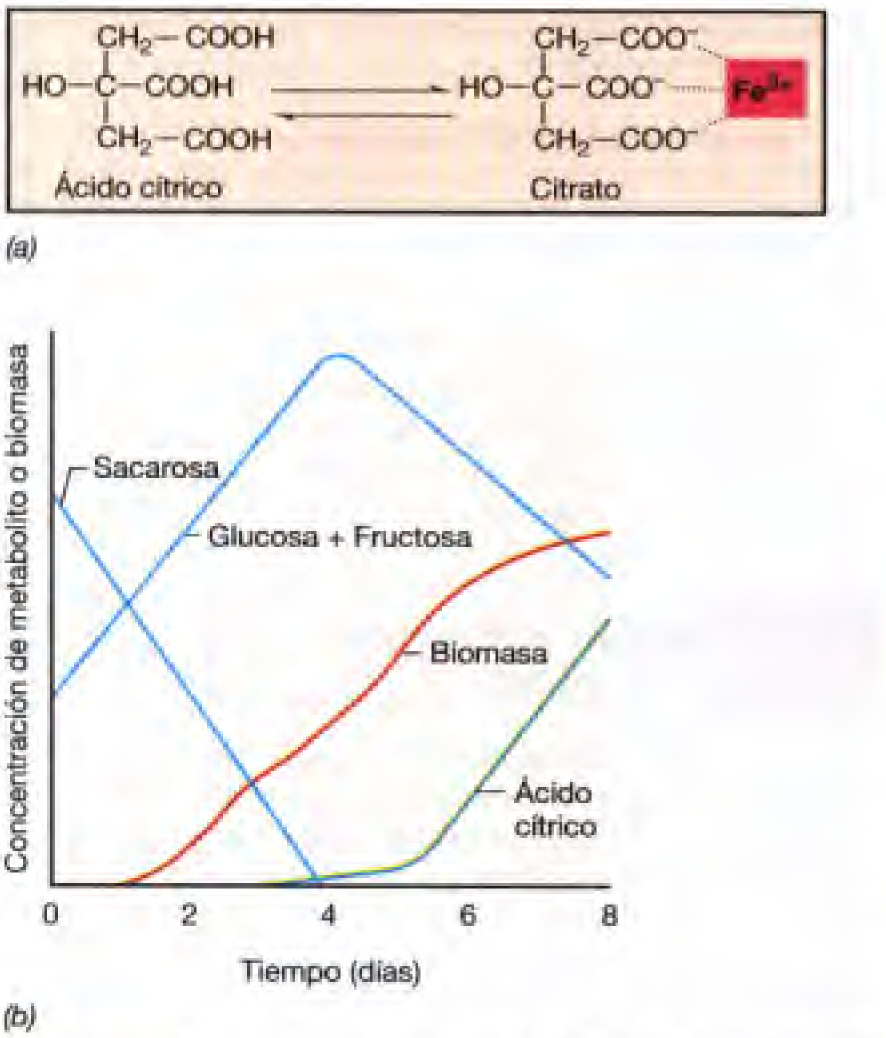


Figura 30.19 Fermentación del ácido cítrico. (a) Estructura del ácido cítrico. Obsérvese que la forma ionizada, el citrato, contiene tres grupos de ácido carboxílico que pueden quelar el hierro (Fe^{3+}). (b) Cinética de la fermentación del ácido cítrico. La sacarosa se degrada mediante la enzima *sucrasa* para formar glucosa + fructuosa. Consúltese el texto para obtener más detalles al respecto.

el hongo productor, o que se añaden al caldo de fermentación, hidrolizan el almidón y dan lugar a azúcares. Por su parte, los azúcares se catabolizan a través de la vía glicolítica (*véase* Sección 5.10) y entran en el ciclo del ácido cítrico, en el que tiene lugar la producción de citrato.

Hoy en día, la mayor parte del ácido cítrico se produce mediante procesos sumergidos en grandes fermentadores. Como *A. niger* es un microorganismo aerobio estricto, para esta fermentación es imprescindible asegurarse de que el cultivo se mantenga bien aireado. El ácido cítrico se produce de esta forma como un metabolito típico secundario. Durante la fase de crecimiento, la sacarosa se descompone en glucosa y fructuosa y, en el momento en el que se alcanza la fase estacionaria, quedan grandes cantidades de estas hexosas, que se convierten en ácido cítrico para contrarrestar la falta del hierro (*véase* Figura 30.19).

Desde el punto de vista histórico, el desarrollo del proceso sumergido para el ácido cítrico tuvo una gran importancia, puesto que fue la primera fermentación industrial *aerobia*. Después, la tecnología de fabricación de fermentadores aerobios se perfeccionó con el proceso del ácido cítrico y, a continuación, esa tecnología se aplicó a la penicilina y a otras fermentaciones de antibióticos importantes. Esto significa que buena parte de nuestro éxito en la producción a gran escala de antibióticos se debe a los trabajos pioneros realizados con la fermentación del ácido cítrico.

✓ 30.11 Revisión de conceptos

Algunos compuestos químicos orgánicos se producen comercialmente mediante el uso de microorganismos. De ellos, el más importante desde el punto de vista económico es el ácido cítrico, que es producido por algunos hongos.

- ✓ ¿Por qué el ácido cítrico producido por *Aspergillus niger* se considera un metabolito secundario (*véase* Figura 3019b)?
- ✓ ¿Cuál es la relación que existe entre la producción de hierro y la producción de ácido cítrico por parte de *A. niger?*

30.12 Levadura como agente de fermentación y como suplemento alimenticio

Las levaduras son los microorganismos más importantes y más ampliamente utilizados en la industria. Se cultivan por sus propias células, por sus componentes celulares y por los productos finales que producen durante la fermentación alcohólica (*véase* Figura 30.1 y Tabla 30.5). Las células de levadura se utilizan asimismo en la fabricación de pan, y también como fuente de alimento, de vitaminas y de diversos factores de crecimiento. La fermentación a gran escala que produce la levadura es la que hace posible la producción de alcohol para propósitos industriales, aunque se la conoce mejor por su papel en la fabricación de bebidas alcohólicas, como son el vino, la cerveza y los licores (*véase* recuadro relativo a los productos de la fermentación de la levadura, en el Capítulo 5).

La producción de células de levadura y la producción de alcohol mediante levadura son dos procesos que se diferencian desde el punto de vista industrial en el hecho de que el primero requiere la presencia de oxígeno para la producción máxima de material celular, mientras que la fermentación alcohólica es anaerobia. Sin embargo, en casi todos los procesos industriales se utiliza una misma especie de levadura, o especies similares de la misma, a saber, *Saccharomyces cerevisiae.*

TABLA 30.5 Usos industriales de la levadura y de los productos de la levadura[a]

Producción de células de levadura
- Levadura de panadero para la fabricación del pan
- Levadura desecada como suplemento alimenticio
- Levadura desecada como pienso animal

Productos de la levadura
- Extracto de levadura para medios de cultivo
- Vitaminas B, Vitamina D
- Enzimas para la industria alimentaria; invertasa (sucrasa), galactosidasa
- Productos para investigación bioquímica: ATP, NAD^+, RNA

Productos de fermentación de la levadura
- Etanol para alcohol industrial y como aditivo de la gasolina
- Glicerol

Alcohol para bebidas
- Cerveza, vino

Bebidas destiladas
- Güisqui, brandy, vodka, ron

[a] *Véase* recuadro relativo a los productos de la fermentación de la levadura, en el Capítulo 5.

Producción de células de levadura

Los panaderos utilizan la levadura como agente estimulante del leudado de la masa antes de su cocción, así como para conferir al pan el aroma que le caracteriza. Durante el proceso de leudado, la levadura se mezcla con la masa húmeda en presencia de una pequeña cantidad de azúcar. Así, la levadura convierte el azúcar en alcohol y CO_2, a continuación de lo cual el CO_2 gaseoso se expande y hace que la masa se levante y se esponje. Cuando se cuece el pan, el calor expulsa el dióxido de carbono y el alcohol, por lo que se forman agujeros dentro de la masa que le dan su textura ligera característica.

La levadura que se utiliza para panadería o para fines alimentarios se cultiva en grandes fermentadores aireados, en un medio que contiene melazas como ingrediente principal. Por su parte, las melazas contienen grandes cantidades de azúcar que sirven como fuente de carbono y de energía y, además, contienen minerales, vitaminas y aminoácidos que son utilizados por la levadura. Para crear un medio completo para el crecimiento de la levadura, se añade además ácido fosfórico (una fuente de fósforo) y sulfato amónico (una fuente de azufre y de nitrógeno).

Las vasijas de fermentación que se utilizan para la producción de levadura tienen una capacidad que oscila entre 40 000 y 200 000 ml. El proceso se inicia con el cultivo de reserva de inóculo puro, al que siguen varias etapas intermedias en las que se va aumentando el inóculo hasta una cantidad adecuada que permita inocular la etapa final (*véase* Figura 30.20*a*). Cabe señalar que no es conveniente añadir todas las melazas al fermentador al mismo tiempo, puesto que esto produciría un exceso de azúcar y la levadura fermentaría parte de este azúcar en alcohol y dióxido de carbono, en lugar de convertirlo en células de levadura. Por lo tanto, en un principio sólo se añade una pequeña cantidad de melazas y, a continuación, a medida que el cultivo de levadura crece y consume este azúcar, se va añadiendo más.

Una vez finalizado el periodo de crecimiento, las células de levadura se recuperan del caldo por centrifugación. A continuación, las células se lavan mediante dilución con agua y se vuelven a centrifugar hasta que adoptan un color claro. La levadura de panadería se comercializa de dos formas, a saber, comprimida en pastillas o como polvo seco. Las *pastillas de levadura prensada* (*véase* Figura 30.20*b*) se fabrican mezclando la levadura centrifugada con agentes emulsionantes, almidón y otros aditivos que le confieren una consistencia adecuada y una duración razonable, a continuación de lo cual el producto se corta en cubitos o en bloques de diversos tamaños para uso doméstico o comercial. Una pastilla de levadura prensada contiene aproximadamente un 70% de humedad, por lo que debe almacenarse en el frigorífico a fin de mantener su capacidad de acción. Por su parte, la levadura que se comercializa en estado seco para panadería suele recibir el nombre de *levadura seca activa* (*véase* Figura 30.20*b*). La levadura lavada se mezcla con adi-

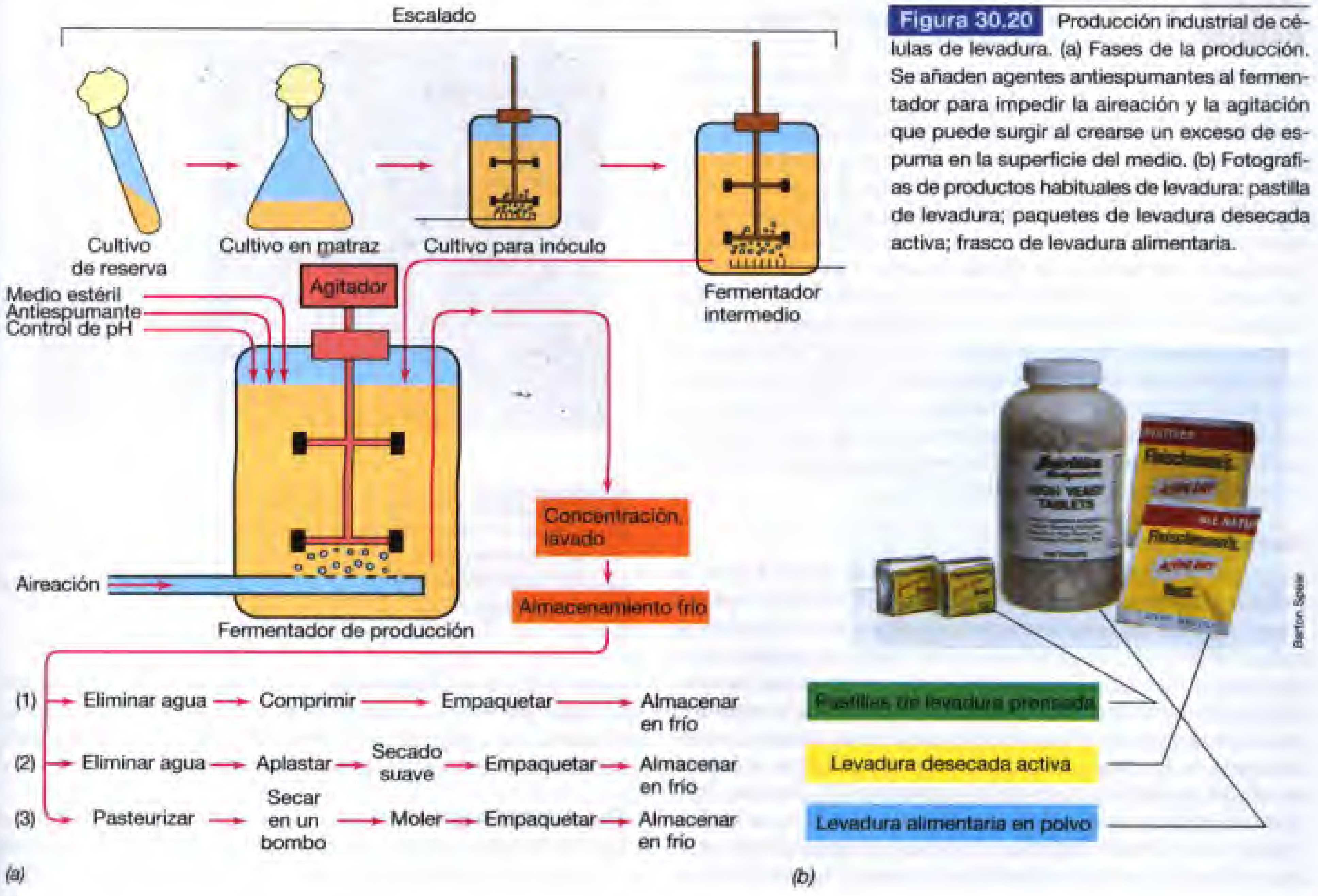

Escalado
Cultivo de reserva
Cultivo en matraz
Cultivo para inóculo
Fermentador intermedio
Medio estéril
Antiespumante
Control de pH
Agitador
Aireación
Fermentador de producción
Concentración, lavado
Almacenamiento frío
(1) Eliminar agua → Comprimir → Empaquetar → Almacenar en frío
(2) Eliminar agua → Aplastar → Secado suave → Empaquetar → Almacenar en frío
(3) Pasteurizar → Secar en un bombo → Moler → Empaquetar → Almacenar en frío
(a)
Pastillas de levadura prensada
Levadura desecada activa
Levadura alimentaria en polvo
(b)
Barton Spear

Figura 30.20 Producción industrial de células de levadura. (a) Fases de la producción. Se añaden agentes antiespumantes al fermentador para impedir la aireación y la agitación que puede surgir al crearse un exceso de espuma en la superficie del medio. (b) Fotografías de productos habituales de levadura: pastilla de levadura; paquetes de levadura desecada activa; frasco de levadura alimentaria.

tivos y se seca al vacío hasta que su contenido en humedad se reduce a un valor aproximado del 8%. Es entonces cuando se introduce en envases con cierre hermético, como son los tambores de fibra, las cajas de cartón o las bolsas de varias capas, en ocasiones en una atmósfera de nitrógeno que favorece una larga conservación. Por último, la *levadura alimentaria*, que se comercializa como suplemento alimenticio (*véase* Figura 30.20*b*), está formada por células de levadura que han sido destruidas por el calor y suelen estar desecadas. Las células de levadura son ricas en vitaminas B y en proteínas, excepto en aminoácidos con azufre. La levadura se añade a la carne y a la harina de cereales para incrementar el valor nutritivo de esos alimentos y, además, se vende en gránulos como alimento saludable (*véase* Figura 30.20*b*).

✓ 30.12 Revisión de conceptos

Las células de levadura se cultivan para utilizarlas en la industria panadera y alimentaria. La levadura comercial se produce a gran escala en fermentadores aireados y utiliza melazas como la principal fuente de carbono y de energía.

- ✓ Escriba una reacción química equilibrada que explique la acción que tiene la levadura en la fabricación del pan
- ✓ ¿Por qué es tan importante mantener condiciones óxicas en el fermentador cuando se cultiva la levadura para obtener células?

30.13 Alcohol y bebidas alcohólicas

El uso de levadura seca en la producción de bebidas alcohólicas es un proceso ancestral. La mayor parte de los zumos de fruta sufren una fermentación natural ocasionada por las levaduras «silvestres» que están presentes en la fruta. A partir de estas fermentaciones naturales, se han seleccionado algunas levaduras para conseguir una producción más controlada, hasta el punto de que, en la actualidad, la producción de bebidas alcohólicas se ha convertido en una industria muy importante en todo el mundo. Las bebidas alcohólicas más importantes son el *vino*, producido por la fermentación del zumo de fruta, la *cerveza*, producida por la fermentación de cereales malteados, y las *bebidas destiladas*, producidas por concentración, mediante destilación, del alcohol procedente de una fermentación. La bioquímica de la fermentación alcohólica por parte de la levadura se encuentra descrita en la Sección 5.10.

Variedades de vino

La mayoría de los vinos procede de las uvas, por lo que la fabricación de esta bebida se produce en los lugares del mundo en los que esta fruta puede cultivarse de una forma más económica (*véase* Figura 30.21). Existen muchas clases de vinos, y su calidad y características varían considerablemente. Los *vinos secos* son vinos en los que han fermentado prácticamente todos los azúcares del zumo o mosto, mientras que, en los *vinos dulces*, se deja parte del azúcar, o bien se añade azúcar después de la fermentación. Un *vino fortificado* o *vino enriquecido* es aquél al que se le ha añadido brandy o algún otro licor después de la fermentación; el jerez y el oporto son vinos fortificados muy conocidos. Por su parte, en un *vino espumoso*, como es el champán, se encuentra presente una considerable cantidad de dióxido de carbono, que surge de una fermentación final que realiza la levadura directamente dentro de la botella.

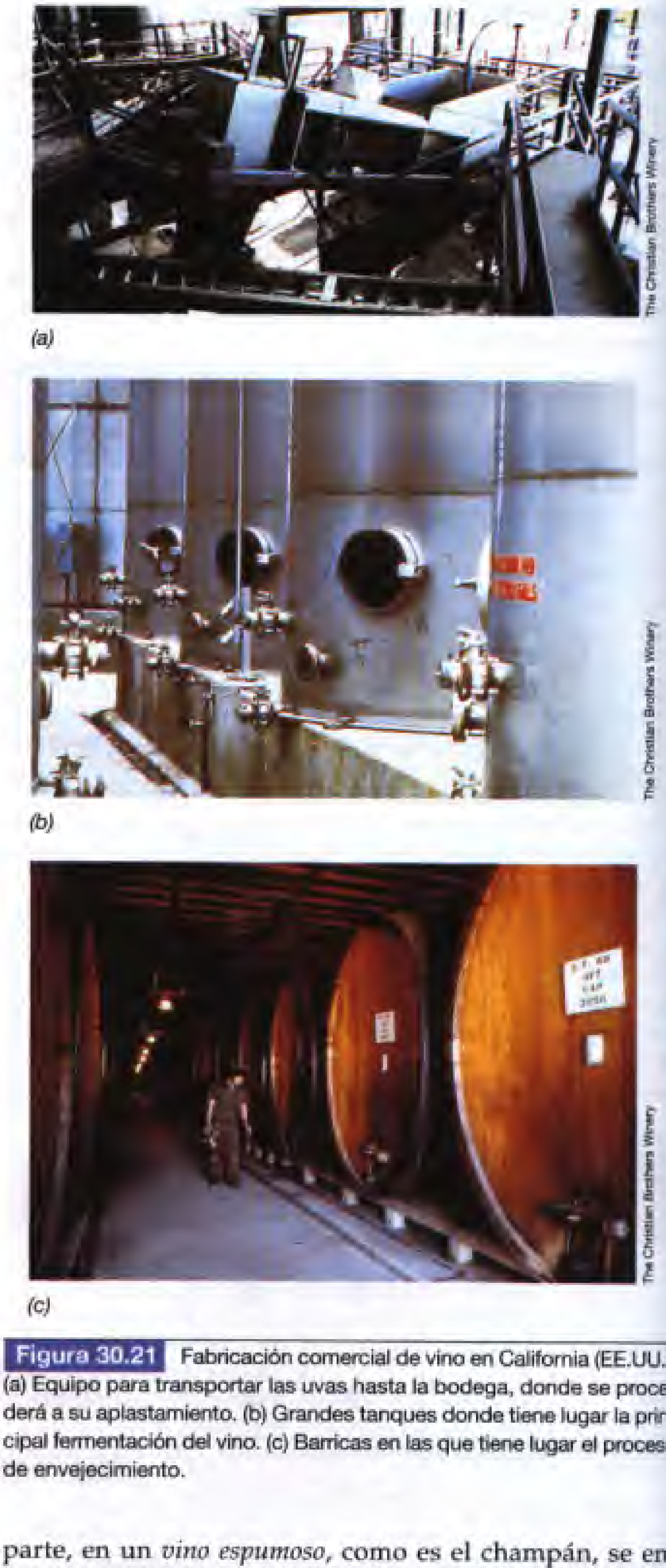

The Christian Brothers Winery
(a)
The Christian Brothers Winery
(b)
The Christian Brothers Winery
(c)

Figura 30.21 Fabricación comercial de vino en California (EE.UU.). (a) Equipo para transportar las uvas hasta la bodega, donde se procederá a su aplastamiento. (b) Grandes tanques donde tiene lugar la principal fermentación del vino. (c) Barricas en las que tiene lugar el proceso de envejecimiento.

Producción de vino

La producción del vino se inicia a comienzos del otoño, con la recolección de la uva. Las uvas se aplastan en una máqui-

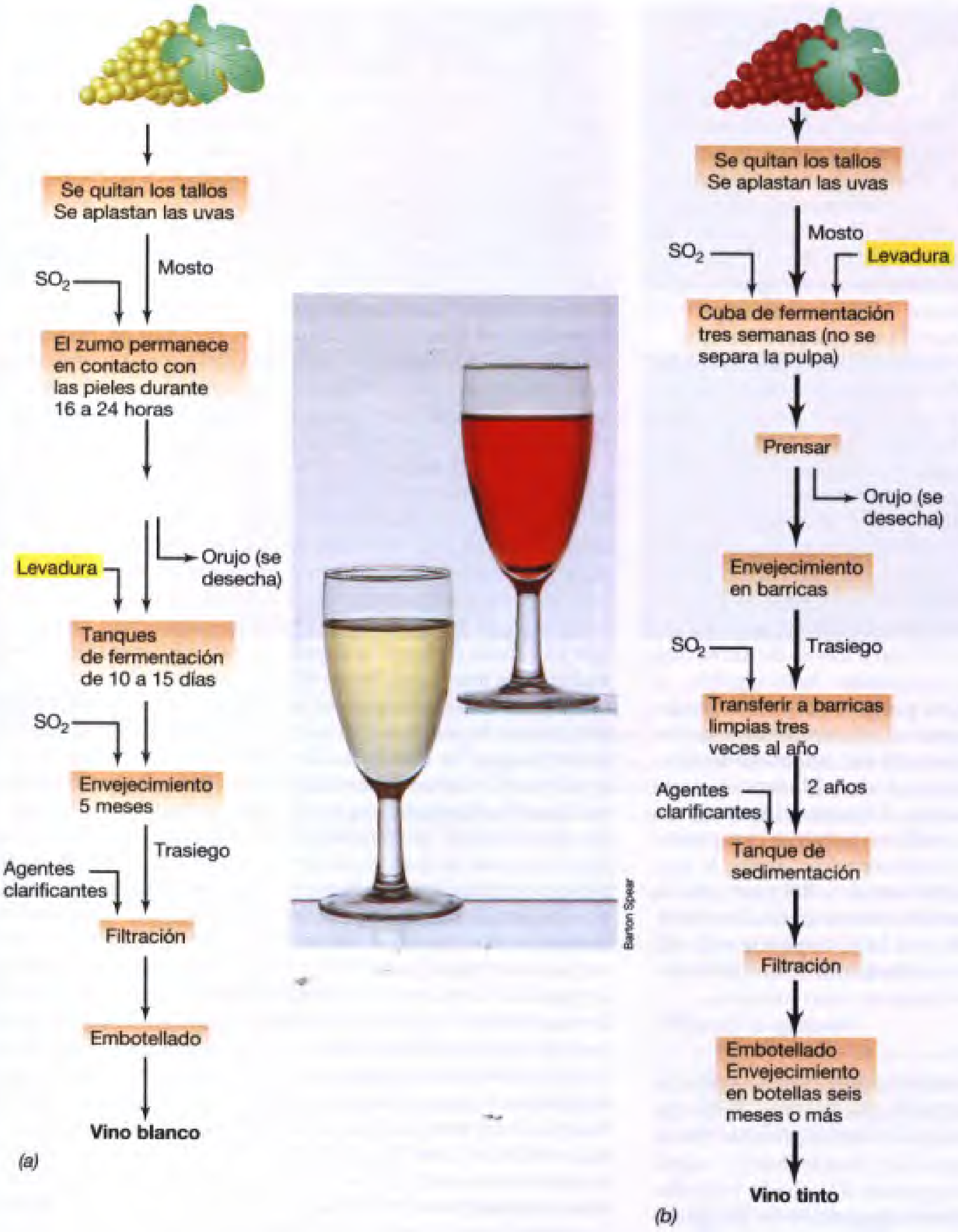

Se quitan los tallos
Se aplastan las uvas
SO₂
Mosto
El zumo permanece en contacto con las pieles durante 16 a 24 horas
Levadura
Orujo (se desecha)
Tanques de fermentación de 10 a 15 días
SO₂
Envejecimiento 5 meses
Agentes clarificantes
Trasiego
Filtración
Embotellado
Vino blanco
(a)
Barton Spear
Se quitan los tallos
Se aplastan las uvas
SO₂
Mosto
Levadura
Cuba de fermentación tres semanas (no se separa la pulpa)
Prensar
Orujo (se desecha)
Envejecimiento en barricas
SO₂
Trasiego
Transferir a barricas limpias tres veces al año
Agentes clarificantes
2 años
Tanque de sedimentación
Filtración
Embotellado
Envejecimiento en botellas seis meses o más
Vino tinto
(b)

Figura 30.22 Producción de vino. (a) Vino blanco. El color de los vinos blancos puede variar desde completamente incoloro a un color pajizo, dependiendo de la uva que se haya utilizado. (b) Vino tinto. El color de los vinos tintos varía desde un color rojo claro a un rojo oscuro borgoña. La fotografía muestra una copa de un Chanin Blanc, un típico vino blanco (a la izquierda) y una copa de vino tinto claro (clarete, a la derecha). Como variedades también típicas de vino blanco cabe citarse el chabil, el vino del Rhin, el sauterne y el chardonnay, mientras que entre las variedades típicas de vino tinto se encuentran el vino de Borgoña, el chianti, el clarete, el zinfandel, el cabernet y el merlot.

na y el zumo, llamado *mosto*, se exprime. Dependiendo de las uvas que se utilicen y de cómo se prepare el mosto, se producirá vino blanco o tinto (*véase* Figura 30.22). El vino blanco se prepara a partir de uvas blancas o a partir del zumo de uvas negras a las que se les ha quitado la piel, que es la parte que contiene el compuesto colorante. En la fabricación del vino tinto, el *orujo* (pieles, semillas y trozos del tallo) se deja durante la fermentación. Además de la diferencia de color, el vino tinto tiene un aroma más fuerte que el blanco, lo que se explica por la presencia de mayores cantidades de sustancias químicas llamadas *taninos*, que se separan de las pieles de las uvas durante la fermentación y pasan al zumo.

Las levaduras que participan en la fermentación del vino son de dos clases: por un lado, las llamadas levaduras silvestres, que están presentes en las uvas cuando se recogen del campo y se transfieren al mosto y, por otro lado, la levadura de vino cultivada, *Saccharomyces ellipsoideus*, que se añade al zumo para iniciar la fermentación. Las levaduras silvestres son menos tolerantes al alcohol que las levaduras cultivadas de vino y, además, pueden producir compuestos no deseados que afectan a la calidad del producto final. Así pues, en muchas bodegas se destruyen las levaduras silvestres presentes en el mosto añadiendo dióxido disulfuro (que aparece en la botella como «sulfitos») en una proporción de aproximadamente 100 partes por millón (ppm). *Saccharomyces ellipsoideus* es resistente a esta concentración de dióxido disulfuro y se añade como cultivo iniciador, preparado a partir de un cultivo puro crecido en zumo de uva esterilizado. La fermentación se realiza en tinajas de varios tamaños, que abarcan desde toneles de 200 litros hasta tanques de 250 000 litros, hechos de madera de roble, de cemento, de piedra o de metal revestido de vidrio (*véase* Figura 30.21*b*). El fermentador debe construirse de tal modo que la gran cantidad de dióxido de carbono que se produzca durante la fermentación pueda escapar sin que se produzca la penetración de aire, lo que se consigue acoplando una válvula unidireccional especial en el tanque.

En el caso del vino tinto, al cabo de tres o cinco días de fermentación ya se ha extraído del orujo una cantidad suficiente de tanino y de color, por lo que el vino pasa a otro tanque para someterlo a otra fermentación que durará una o dos semanas más. El paso siguiente recibe el nombre de *trasiego*. El vino se separa del sedimento, que contiene la levadura y un precipitado orgánico, y se almacena a continuación a una temperatura inferior para lograr el envejecimiento, el desarrollo del aroma y la posterior clarificación. La clarificación final puede acelerarse mediante la adición de los llamados *agentes de refinado* como caseína, tanino o arcilla bentonita, o bien filtrando el vino a través de tierra diatomácea, asbestos o filtros de membrana. Acto seguido, el vino se embotella y se almacena para su posterior envejecimiento, o se vende. Por lo general, el vino tinto se envejece durante dos o más años después del embotellado (*véase* Figura 30.21*c*), mientras que el vino blanco se suele vender sin mucho envejecimiento. Durante el proceso de envejecimiento, se producen cambios químicos complejos, incluida la reducción de los componentes amargos, lo que da como resultado la mejora del aroma y del olor, que se conoce con el nombre de *buqué*. El contenido final en alcohol del vino oscila entre el 6% y el 14%, dependiendo del contenido en azúcar de las uvas, de la duración de la fermentación y de la cepa de levadura de vino utilizada.

La industria cervecera

La fabricación de bebidas alcohólicas obtenidas a partir de granos de malta se denomina en inglés *brewing*. Entre las bebidas malteadas típicas se encuentran las diversas clases de cerveza normal (*lager*), ligera (*ale*), fuerte (*bock*) y negra (*stout*). La *malta* se prepara con granos de cebada y contiene enzimas naturales que digieren el almidón de los cereales y lo convierten en azúcar. Como las levaduras cerveceras no son capaces de digerir el almidón (*véase* Figura 3.6*b*), el proceso de malteado es esencial para la preparación de material fermentable a partir de granos de cereales.

El líquido fermentable a partir del que se fabrican las cervezas se prepara en un proceso que se conoce con el nombre de *amasado*. La masa puede estar compuesta únicamente por cebada o por otros cereales, como el maíz, el arroz o el trigo. La mezcla de ingredientes que forman la masa se cuece y se deja macerar en una gran cuba a temperatura templada. Durante el proceso de calentamiento, las enzimas de la malta digieren el almidón y liberan azúcares que, a continuación, son fermentados por la levadura. También se liberan proteínas y aminoácidos que pasan al líquido, igual que ocurre con otros nutrientes necesarios para el crecimiento de la levadura.

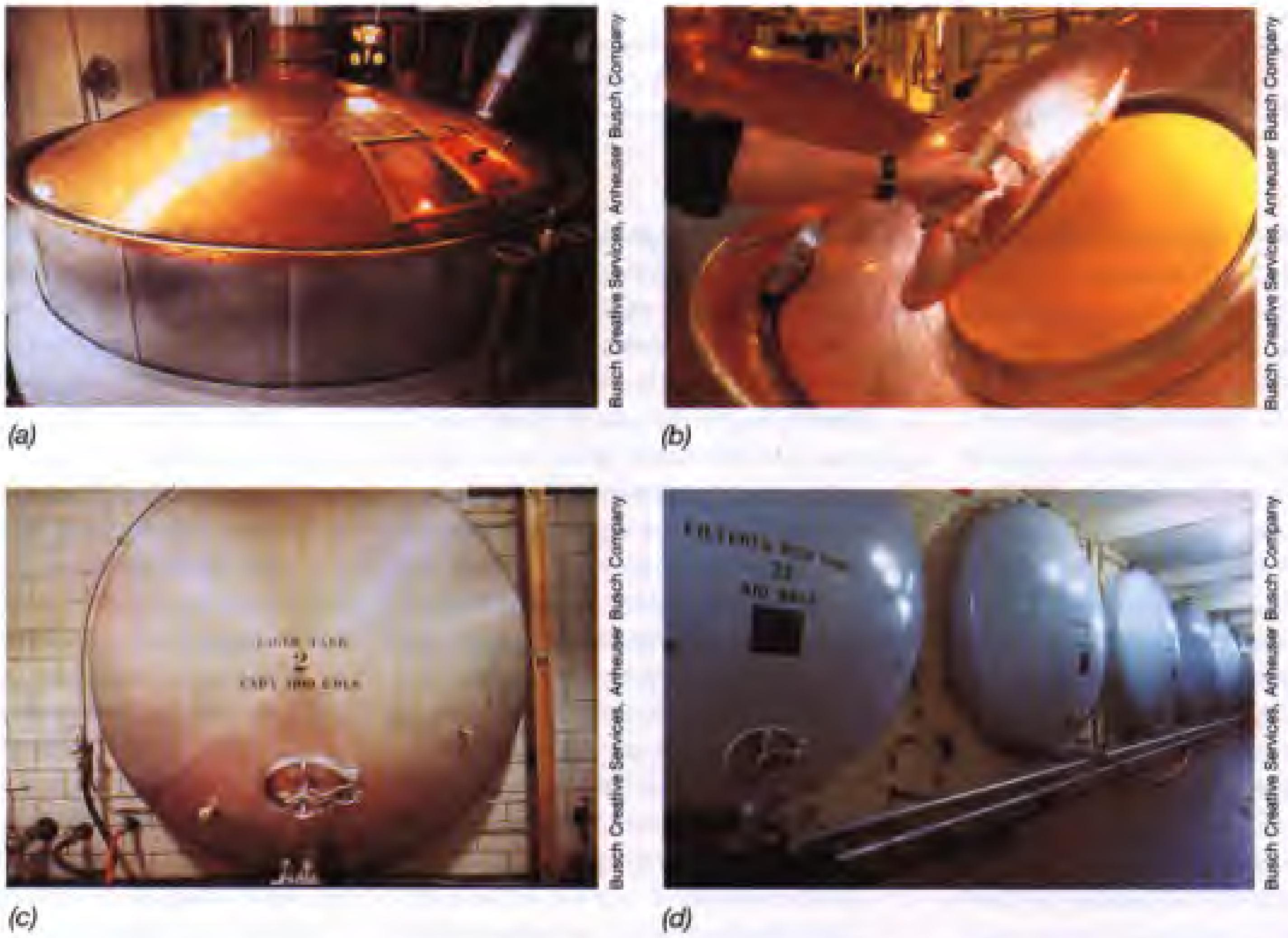
Tras la cocción, el extracto acuoso, llamado *mosto de cerveza*, se separa por filtración de las cascarillas y de los demás residuos de la masa. En esta etapa se añade al mosto de cerveza flores femeninas de una planta aromática llamada *lúpulo*. El lúpulo es un ingrediente aromatizante que también tiene propiedades antimicrobianas, lo que probablemente contribuye a impedir la contaminación en la fermentación siguiente. Después, el mosto se cuece, generalmente en grandes calderas de cobre (*véase* Figura 30.23*a*, *b*), durante varias horas, en las que se extraen los ingredientes deseados del lúpulo, se coagulan y eliminan las proteínas presentes en el mosto de cerveza que no son convenientes para mantener la estabilidad de la misma, y se esteriliza el mosto de cerveza. A continuación, el mosto se filtra de nuevo, se refrigera y se transfiere a la vasija de fermentación.

Las cepas de levadura cervecera son de dos tipos principales: de fermentación en superficie y de fermentación en el fondo. La principal diferencia que existe entre estas dos clases de levadura consiste en que las **levaduras de fermentación en superficie** permanecen distribuidas de forma homogénea en el mosto de fermentación y son transportadas a la superficie por el dióxido de carbono gaseoso que se genera durante la fermentación, mientras que las **levaduras de fermentación en el fondo** se depositan en la parte inferior. Las levaduras de fermentación en superficie se utilizan en la preparación de cervezas ligeras (tipo «ale»), mientras que las levaduras de fermentación en el fondo se emplean para fabricar cervezas rubias (tipo «lager»). Las levaduras de fermentación en el fondo suelen ser de la especie denominada *Saccharomyces carlsbergensis*, mientras que las levaduras de fermentación en superficie pertenecen al género *Saccharomyces cerevisiae*. La fermentación realizada por las levaduras de superficie se produce por lo general a temperaturas más altas (entre 14°C y 23°C) que la de las levaduras de fondo (entre 6°C y 12°C) y, además, se realiza en un periodo más corto de tiempo (cinco a siete días para la fermentación de superficie frente al periodo de 8 a 14 días para la fermentación de fondo). Una vez que las levaduras de fondo finalizan la fermentación de la cerveza «lager», ésta se bombea y pasa a tanques más grandes, donde se almacena a una baja temperatura (alrededor de −1°C) durante varias semanas (*véase* Figura 30.23*c*). Tras el proceso de almacenamiento, la cerveza se filtra y se deposita en tanques de almacenamiento (*véase* Figura 30.23*d*) a partir de los cuales se extrae para su envasado. Por su parte, la cerveza fermentada en superficie se almacena durante breves periodos de tiempo a una temperatura más alta (entre 4°C y 8°C), que ayuda a desarrollar el aroma característico de esta cerveza.

Si desea obtener más detalles sobre el proceso de fabricación de la cerveza, consulte el recuadro «Fabricación casera de cerveza».

Bebidas alcohólicas destiladas

Las bebidas alcohólicas destiladas se fabrican calentando un líquido fermentado a una temperatura alta que volatiliza la mayor parte del alcohol. El alcohol se condensa a continuación y se recoge en un proceso que recibe el nombre de *destilación*. Con este proceso puede obtenerse un producto con


(a) (b) (c) (d)

Busch Creative Services, Anheuser Busch Company

Figura 30.23 Fabricación de cerveza en una planta industrial. (a, b) La caldera de cobre es el lugar en el que el mosto se mezcla con el lúpulo, a continuación de lo cual se lleva a ebullición. Desde la caldera, el líquido se pasa a grandes tanques de fermentación, en los que la levadura fermenta la glucosa y da lugar a etanol más dióxido de carbono. (c) Si se va a fabricar una cerveza tipo lager, la cerveza se almacena a continuación durante varias semanas a baja temperatura en tanques, donde se produce la sedimentación de partículas, incluidas las células de levadura. (d) Por último, la cerveza se filtra y se deposita en tanques de almacenamiento a partir de los que se envasa en pequeños barriles, en botellas o en latas.

contenido mucho más alto en alcohol que el que se consigue con una fermentación directa. Prácticamente cualquier líquido alcohólico puede destilarse, y cada uno de ellos dará lugar a una bebida destilada con unas características propias. Así, la destilación de las bebidas con malta da lugar al *güisqui*, el vino destilado da lugar al *brandy*, la destilación de melazas fermentada produce *ron*, la destilación de cereales o de patata fermentados genera *vodka*, y la destilación de cereales y bayas de enebro produce *ginebra* (*véase* Figura 30.24).

El destilado no sólo contiene alcohol, sino además otros productos volátiles procedentes de la fermentación realizada por la levadura o de los propios ingredientes. Algunos de estos otros productos son ingredientes deseables para el aroma, mientras que otros no lo son. Así, para eliminar estos últimos, el producto destilado suele someterse a un proceso de envejecimiento, habitualmente en barricas de madera. Durante el proceso de envejecimiento, los productos no deseados se eliminan, al tiempo que se desarrollan nuevos ingredientes deseables para aportar aroma el producto final. El destilado recién obtenido suele ser incoloro, mientras que el producto envejecido suele tener un color amarillo o pardo (*véase* Figura 30.24). Las características del producto final dependen en parte del tipo y la duración del proceso de envejecimiento (un tiempo de envejecimiento de diez años o más es algo habitual en algunas bebidas destiladas), lo que significa que el proceso de fabricación de bebidas alcohólicas destiladas es sumamente complejo. En su mayor parte, el proceso se realiza siguiendo métodos tradicionales que han demostrado (en la práctica) dar un producto determinado de calidad, más que por métodos probados científicamente.

Etanol a granel

La producción de etanol como sustancia química a granel es uno de los procesos biocatalíticos más importantes y hoy en día se fabrican casi 400 mil millones de litros de alcohol al año en los Estados Unidos, principalmente por la fer-

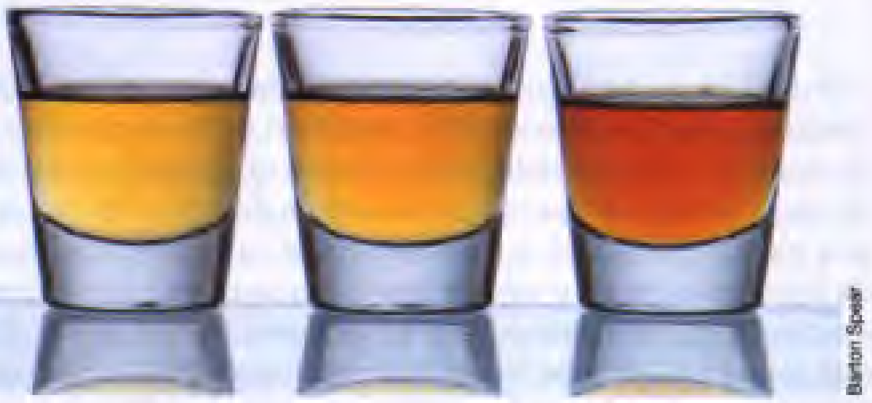

Barton Spear

Figura 30.24 Color de las bebidas destiladas. La ginebra o el vodka (no mostrados) son incoloros. Sin embargo, el envejecimiento en barricas de madera confiere un color ámbar o amarillo característico de algunas bebidas destiladas. De izquierda a derecha, ron, brandy y güisqui.

Técnicas y Aplicaciones ... Fabricación casera de cerveza[1]

El fabricante de cerveza aficionado puede fabricar muchas clases de cerveza, desde la amarga (*bitter*) inglesa y la rubia suave (*pale ale*) de la India, hasta la fuerte (*bock*) alemana y la cerveza negra (*stout*) de la Rusia imperial. El equipo y las materias primas que se necesitan pueden comprarse en cualquier tienda especializada de fabricantes de vinos y cervezas.

El proceso de fabricación de la cerveza puede dividirse en tres etapas fundamentales: preparación del mosto de cerveza, realización de la fermentación, y embotellado y envejecimiento. Las características de la fabricación dependen de muchos factores, como son la proporción de malta, azúcar, lúpulo y cereales, el tipo de levadura, la temperatura y la duración de la fermentación, así como de la forma en la que se realice el proceso de envejecimiento. El fermentador es una vasija de vidrio de unos 20 litros que puede cerrarse con cierre hermético. Para obtener una cerveza de buena calidad es imprescindible esterilizar *todo* el material que entre en contacto con el mosto, a saber, el fermentador, las mangueras, la cuchara de remover y las botellas. El procedimiento más idóneo consiste en utilizar un líquido esterilizante, que consta de 50 o 60 ml de lejía, y 20 litros de agua. Se sumergen en él todos los componentes durante 15 minutos y, a continuación, se aclaran ligeramente con agua caliente o se secan al aire.

1. **Preparación del mosto (*véase* Figura 1).** En la fabricación comercial de la cerveza, el mosto se realiza extrayendo los azúcares fermentables y los nutrientes de la levadura de la malta, el azúcar y el lúpulo. El proceso es complejo, por lo que es relativamente difícil conseguir resultados satisfactorios. Muchos cerveceros domésticos fabrican su propio mosto a partir de la malta, pero se puede obtener una cerveza razonablemente buena a partir de un extracto de malta aromatizado con lúpulo, que se vende ya preparado. Los extractos de malta se presentan en una gran variedad de aromas y colores, y el tipo de cerveza depende del tipo de extracto de malta utilizado. Una receta sencilla para hacer el mosto consiste en utilizar entre 2,25 y 2,75 kilos de extracto de malta aromatizado con lúpulo y mezclarlo con 20 litros de agua. Se hierve el extracto de malta con seis litros de agua durante 15 minutos en un recipiente de porcelana esmaltada o de acero inoxidable; debe evitarse las calderas de aluminio debido a la inhibición que producen los metales que se desprenden en este caso (*véase* **Figura 1**). El mosto caliente se vierte a continuación en 14 o 15 litros de agua fría y limpia, que ya se ha añadido al fermentador. Cuando la temperatura ha alcanzado un valor inferior a 30°C se añade la levadura para iniciar la fermentación.
2. **Realización de la fermentación (*véase* Figura 2).** Se añaden dos paquetes de levadura de cerveza fresca al mosto ya frío y se cubre el fermentador con un tapón de goma en el que se ha insertado una manguera de plástico. La manguera se dirige hacia un balde que contiene agua. Durante los dos o tres primeros días de fermentación, se desprenderán grandes cantidades de dióxido de carbono, que saldrán a través de la manguera. El sifón de agua sirve para evitar que se produzca una penetración de le-

Bryan Burch

Figura 1

Bryan Burch

Figura 2

---

[1] Fuente original: Burch B. (1992): *Brewing Quality Beers -The Home Brewer's Essential Guidebook*, 2.ª edición, Joby Books, Fulton, CA.

mentación de almidón de cereales. Este etanol se utiliza como disolvente industrial y también para la producción de *gasohol*, un combustible sin plomo que contiene un 10% de etanol en gasolina. La combustión del gasohol produce una menor cantidad de monóxido de carbono y de óxidos de nitrógeno que la gasolina pura, por lo que se vende como un combustible más limpio y se aconseja su uso en las grandes ciudades, donde la contaminación debido a los automóviles es alta. Ya se han utilizado algunas levaduras en la producción de etanol a granel, incluidas las especies *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Candida*, aunque la mayor parte del etanol de los Estados Unidos se produce mediante la primera de ellas.

✓ 30.13 Revisión de conceptos

Las bebidas alcohólicas son producidas por una levadura, que fermenta el azúcar y lo convierte en alcohol etílico y dióxido de carbono. El vino se produce a partir del zumo de uva, la cerveza, a partir de cereales malteados, y las bebidas destiladas, a partir de la destilación de soluciones fermentadas. El alcohol a granel se utiliza como aditivo para la gasolina y como disolvente industrial.

- ✓ ¿Cómo se diferencian los vinos en cuanto a la cantidad de alcohol que contienen?
- ✓ ¿Cuáles son las principales diferencias entre una cerveza normal y una cerveza ligera (*ale*)?

vaduras silvestres o bacterias en el fermentador. Después de aproximadamente tres días, la actividad disminuirá, puesto que los azúcares fermentables se han agotado. En este momento, el tapón de goma y la manguera se reemplazan por un cierre de fermentación, que no es caro. El cierre de fermentación, que puede adquirirse en cualquier tienda especializada, no sólo evita la contaminación, sino que al mismo tiempo permite eliminar la pequeña cantidad de gas que sigue produciéndose. Se deja fermentar la cerveza de 7 a 10 días a una temperatura comprendida entre 10°C y 15°C.

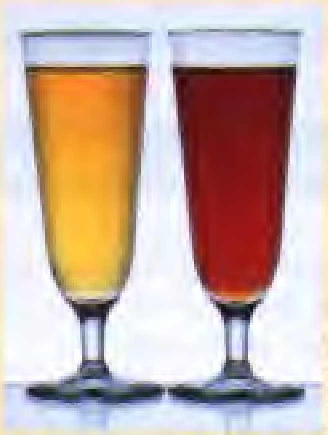
3. **Embotellado y envejecimiento (*véase* Figura 3).** La fermentación debe producirse durante los 7 o 10 días completos, aun cuando la fermentación más enérgica haya cesado antes. Para entonces, la mayor parte de la levadura debe haberse sedimentado en el fondo del fermentador. Mediante la utilización de un sifón, la cerveza se separa cuidadosamente de la capa de levadura y se pasa a botellas de vidrio. Hay que tener cuidado de que la levadura que se encuentre en el fondo del fermentador no se revuelva y quede en el fondo el líquido rico en levadura. Las botellas utilizadas deben admitir los tapones de corona estándar, que deberán ser nuevos y limpios en cada utilización. Antes de poner dicho tapón, se añaden tres cuartas partes de cucharadita (pero no más) de jarabe de maíz a cada botella de 350 o 465 ml. Una vez cerradas las botellas, se invierten para que se mezcle el azúcar del jarabe y, a continuación, se deja que la cerveza envejezca a temperatura ambiente y en posición vertical, al menos durante un periodo comprendido entre 7 y 10 días. Una vez finalizado este periodo de envejecimiento, la cerveza puede almacenarse a una temperatura más fría.

Bryon Burch

Figura 3

Todas las cervezas caseras tienen un sedimento de levadura natural en el fondo de la botella. La cerveza mejorará su calidad si se deja que envejezca durante varias semanas. De hecho, el envejecimiento hace que la cerveza sea más suave. Utilizando el mismo equipo básico de producción, pueden fabricarse varios tipos de cerveza, cada uno con su sabor y carácter distintivo (la cita bibliográfica incluida en la nota a pie de página contiene algunas recetas de cerveza). Las cervezas oscuras, que por lo general contienen más alcohol que las cervezas más claras, requieren más malta para su producción y suelen fabricarse a partir de una combinación de diferentes malta, como las que se obtienen de variedades más oscuras de cereales o de las que se han tostado para caramelizar los azúcares y conseguir un color más oscuro. Un estilo típico de cerveza ligera americana (*véase* **Figura 4**, a la izquierda) contiene un 3,5% de alcohol (en volumen), mientras que la cerveza oscura del tipo Munich contiene un 4,25% y la cerveza fuerte (*bock*), un 5%.

La tendencia a la «individualización» de la cerveza puede comprobarse no sólo en el número creciente de fabricantes caseros de cerveza, sino en el hecho de que las principales fábricas de cerveza de los Estados Unidos están notando cada vez más la competencia de nuevas fábricas, generalmente muy pequeñas, que reciben el nombre de *microindustrias cerveceras*. Aunque la producción total de una de estas microindustrias puede parecer insignificante en comparación con la de las principales industrias cerveceras, los productos tienen su propio carácter distintivo y atractivo local. Parte de estas diferencias se debe, probablemente, a la escala más pequeña a la que se realiza la fabricación, pero también, sin duda, al uso de ingredientes, agua, cepas de levadura y tiempos de fabricación distintos. ■



Barton Spear

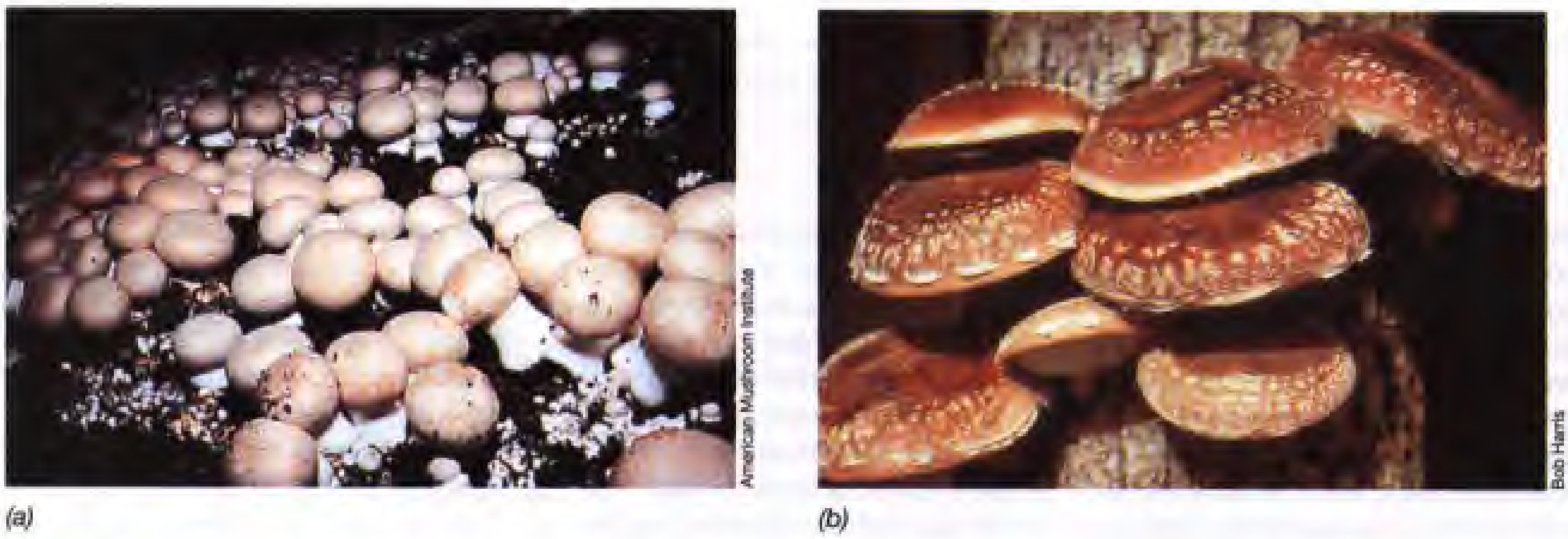
Figura 4

30.14 Las setas como fuente de alimento

Algunos tipos de *hongos* representan fuentes de alimentos para el hombre y, de ellos, los más importantes son las setas. Las setas son un grupo de hongos filamentosos que forman grandes estructuras comestibles denominadas **cuerpos fructíferos** (*véase* Figura 30.25). El cuerpo fructífero se conoce por lo general con el nombre de *seta*, y se forma gracias a la asociación de un gran número de hifas individuales que forman un micelio. De todos modos, en la Sección 14.10 ya describimos la biología básica de las setas.

Crecimiento comercial de las setas

La seta que se comercializa en más partes del mundo es *Agaricus bisporus*, que generalmente se cultiva en granjas de setas. El microorganismo se cultiva en lechos especiales, generalmente en edificios en los que la humedad y la temperatura se controlan de un modo muy estricto (*véase* Figura 30.25*a*). Los lechos se preparan mezclando suelo con un material muy rico en materia orgánica, como puede ser el estiércol de caballo y, a continuación, se inoculan con el *micelio* de la seta. El micelio es en realidad un cultivo puro del hongo que se ha cultivado en grandes frascos sobre un medio rico en componentes orgánicos. En el lecho, el micelio crece y se extiende por el sustrato y, al cabo de varias



American Mushroom Institute

Bob Harris

Figura 30.25 Producción industrial de setas. (a) Vista cercana de un brote de setas. (b) Vista cercana de la seta shiitake.

semanas, está listo para el siguiente paso, que consiste en la inducción de la formación de setas. Esto se consigue añadiendo a la superficie del lecho una capa de suelo denominada *cubierta*. El aspecto de las setas en la superficie del lecho se llama *brote* (*véase* Figura 30.25*a*) y, cuando brotan las setas, deben recolectarse inmediatamente, mientras aún están frescas.

Otra seta ampliamente cultivada es el **shiitake**, *Lentinus edulus*. Esta seta, que es la más ampliamente cultivada en el Lejano Oriente, está ampliando su demanda en la actualidad en los Estados Unidos. El shiitake es un hongo que digiere la celulosa, que crece bien en árboles de madera dura y que se cultiva sobre pequeños troncos (*véase* Figura 30.25*b*). Los troncos se sumergen en agua para tratarlos y, a continuación, se inoculan insertando trozos de micelio en los pequeños orificios que se han practicado en ellos. El hongo crece por todo el tronco y, transcurrido aproximadamente un año, forma una floración de cuerpos fructíferos (*véase* Figura 30.25*b*). Mucha gente considera que el shiitake es más sabroso que *Agaricus bisporus* y, por esta razón, su precio aumenta cada vez más.

✓ 30.14 Revisión de conceptos

El alimento más importante que se produce a partir de microorganismos es la seta, que se produce no por su proteína, sino por su aroma

- ✓ ¿Por qué se considera que las setas son microorganismos?
- ✓ ¿Qué es un *brote de seta?*

Preguntas de repaso

1. ¿En qué se diferencian los microorganismos industriales de los microorganismos convencionales?, ¿en qué son similares?
2. Describa algunas de las técnicas que se pueden utilizar para mejorar las cepas de los microorganismos industriales.
3. Cite tres tipos principales de productos industriales que puedan obtenerse con microorganismos y dé dos ejemplos de cada uno de ellos.
4. Dé un ejemplo de un *compuesto químico a granel* producido por un microorganismo y describa brevemente el proceso mediante el que se fabrica dicho producto.
5. Compare y señale las diferencias entre los *metabolitos primarios* y los *metabolitos secundarios*, y dé un ejemplo de cada uno de ellos. Incluya al menos dos explicaciones de las bases moleculares por las que algunos metabolitos son secundarios en vez de primarios.
6. ¿En qué se diferencia un fermentador industrial de un matraz de cultivo de laboratorio?
7. Describa los problemas que se presentan en el escalado desde el punto de vista de la *aireación*, la *esterilización* y el *control del proceso*. ¿Por qué es tan importante la estabilidad en un fermentador industrial?
8. Cite tres *antibióticos* que sean importantes desde el punto de vista industrial. Para cada uno de estos antibióticos, indique el microorganismo que lo produce, la estructura química general y el modo de acción.
9. Compare y señale la diferencia entre la producción de antibióticos β-lactámicos *naturales*, *biosintéticos* y *semisintéticos*.
10. ¿Qué metal hay que añadir al medio de fermentación para mejorar drásticamente la producción de vitaminas B_{12}?
11. ¿Qué características inusuales debe tener un microorganismo para producir en exceso y secretar un aminoácido como la lisina?
12. Defina en qué consiste la *bioconversión microbiana* y dé un ejemplo. Explique las razones por las que las reacciones químicas implicadas en las bioconversiones mi-

crobianas se realizan más veces por métodos microbianos que por métodos químicos.

13. Cite tres tipos diferentes de enzimas que se produzcan comercialmente. Para cada una de estas enzimas, indique el microorganismo que se utiliza en su producción comercial, la acción de la misma y la forman en la que ésta se utiliza en el comercio.
14. Describa qué es el *sirope rico en fructuosa*, indique cómo se produce y explique para qué se utiliza en la industria alimentaria.
15. ¿Qué son las extremozimas?, ¿qué usos industriales tienen?
16. Incluya dos razones por las que los fermentadores de acero inoxidable se utilizan en la producción industrial de ácido cítrico.
17. ¿Por qué tienen las levaduras tanta importancia industrial?
18. ¿En qué se parece la fabricación de la *cerveza* a la fabricación del *vino*?, ¿en que se diferencian estos procesos? ¿En que se diferencia la producción de *bebidas alcohólicas destiladas* de la de cerveza o vino?
19. ¿Qué parte de la seta se consume normalmente como comida? ¿Qué hay dentro de esta estructura?

Ejercicios prácticos

1. Como investigador de una empresa farmacéutica, le han asignado la tarea de encontrar y desarrollar un antibiótico que sea eficaz frente a un nuevo patógeno bacteriano. Describa el plan que seguiría para desarrollar este proceso, desde el aislamiento de un microorganismo productor con bajo rendimiento hasta la producción industrial del nuevo antibiótico con alto rendimiento.
2. Una botella a medio consumir de un vino tinto «orgánico» (que no contiene conservantes) se vuelve a tapar y se almacena refrigerada durante dos meses. Al probar el vino de nuevo, nota un sabor amargo distinto, que hace que el vino no se pueda beber. Utilizando la información presentada en este capítulo y en la Sección 12.8, describa (a), el proceso mediado por microorganismos que ha tenido lugar en el vino y (b), un método sencillo por el que este proceso podría haberse evitado.
3. Supongamos que desea producir gran cantidad del aminoácido fenilalanina para utilizarlo en la producción del edulcorante *aspartamo*. El microorganismo superproductor que desea utilizar no está sujeto a inhibición por retroalimentación por fenilalanina, pero está sometido a una represión típica de las enzimas de la biosíntesis de la fenilalanina por un exceso de la misma. Aplicando los principios de la regulación de las enzimas estudiados en el Capítulo 8, describa dos clases de mutantes que podría aislar para superar este problema y explique las lesiones genéticas que tendrían cada uno de ellos.

Desde un punto de vista científico, la capacidad para manipular el DNA en un tubo de ensayo y, a continuación, volver a colocar el DNA alterado en un organismo para que se exprese, constituye una técnica tremendamente útil que tiene un potencial enorme. Las aplicaciones prácticas de esta tecnología incluyen la utilización de microorganismos para producir proteínas de mamíferos y vacunas nuevas, aunque éstos también pueden utilizarse en aplicaciones que intentan responder a preguntas relacionadas con la ciencia en general. En nuestro ejemplo, el gen que codifica una proteína fluorescente denominada *proteína fluorescente verde* se ha fusionado con otro gen de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, lo que permite realizar estudios sobre la localización de las proteínas. Cuando se consigue la proteína de interés, la proteína fluorescente verde también se crea y viaja con la primera hasta su destino dentro de la célula, lo que determina el punto de ésta en la que se encuentra activa la proteína de interés.

31

INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

I TÉCNICAS DE LA INGENIERÍA GENÉTICA 987

31.1 Resumen de los principios fundamentales de la ingeniería genética 987
31.2 Hospedadores para vectores de clonación 989
31.3 Búsqueda del clon idóneo 991
31.4 Vectores especializados 993
31.5 Expresión de genes de mamíferos en bacterias 996

II APLICACIONES PRÁCTICAS DE LA INGENIERÍA GENÉTICA 1000

31.6 Obtención de productos de mamíferos y de vacunas mediante organismos genéticamente modificados 1000
31.7 Ingeniería genética en plantas agrícolas 1005
31.8 Ingeniería genética en animales y en genética humana 1008

Glosario

Biotecnología uso de organismos vivos para llevar a cabo procesos químicos concretos destinados a la aplicación industrial

Clonación molecular aislamiento e incorporación de un fragmento de DNA dentro de un vector en el que puede replicarse

Gen indicador gen incorporado a un vector porque el producto que codifica resulta fácil de detectar

Huella dactilar del DNA uso de técnicas de la ingeniería genética para determinar el origen del DNA en una muestra de tejido

Ingeniería genética uso de técnicas *in vitro* para conseguir el aislamiento, la manipulación, la recombinación y la expresión del DNA, así como para desarrollar *organismos genéticamente modificados*

Organismo genéticamente modificado (GMO) organismo cuyo genoma ha sido modificado utilizando métodos de la ingeniería genética. El acrónimo *GM* también se utiliza en construcciones tales como *cosechas GM* y *alimentos GM*

Organismos transgénicos plantas o animales que incorporan de forma estable DNA clonado que ha sido introducido dentro de ellos

***Plásmido** Ti* plásmido que está en especies de *Agrobacterium* capaz de transferir genes desde las bacterias a las plantas

Sonda de ácido nucleico cadena de ácido nucleico que se puede marcar y utilizar para formar un híbrido con una molécula complementaria procedente de una mezcla de otros ácidos nucleicos

T-DNA segmento del plásmido Ti de la bacteria *Agrobacterium* que se transfiere a las células vegetales

Terapia génica tratamiento de una enfermedad causada por la disfunción de un gen, que consiste en la introducción de una copia correcta de dicho gen

Traducción inversa proceso mental que consiste en utilizar una tabla de codones y la secuencia de una proteína con el fin de obtener la posible secuencia del mRNA o el gen que codificó dicha proteína

Vector de expresión vector de clonación que contiene las secuencias reguladoras necesarias para permitir la transcripción y la traducción de genes clonados.

Vector de integración vector de clonación que se integra en el cromosoma de un hospedador

Vector lanzadera vector de clonación que puede replicarse en dos o más hospedadores distintos

---

La **biotecnología** es el uso de organismos vivos para llevar a cabo procesos químicos concretos destinados a la aplicación industrial o comercial. En este sentido, la biotecnología no sólo se refiere a las ramas de la microbiología industrial que se describieron en el Capítulo 30, sino a muchos otros sectores. Sin embargo, el uso que se hace en la actualidad de la palabra «biotecnología» implica que el organismo que se ha utilizado para llevar a cabo el proceso ha sido manipulado mediante técnicas genéticas *in vitro*, tales como las que se describieron en el Capítulo 10.

Estas técnicas permiten aislar, manipular y secuenciar el DNA, así como controlar la expresión del mismo. En el Capítulo 5 vimos la forma en la que estas técnicas pueden utilizarse para examinar genomas enteros. El uso de estas técnicas *in vitro* y, en particular, la clonación molecular (*véase* Sección 10.14), que dan lugar a *organismos genéticamente modificados*, recibe con frecuencia el nombre de **ingeniería genética**. En los Capítulos 10 y 15 nos dedicamos fundamentalmente a los usos que se hacen de estas técnicas en la investigación básica. Sin embargo, la ingeniería genética también ha encontrado aplicaciones *prácticas* muy importantes que incluyen, por ejemplo, el desarrollo de cultivos microbianos capaces de producir valiosos productos, tales como insulina humana, hormona humana del crecimiento, interferón, diversas vacunas y enzimas industriales. En este capítulo describiremos algunas de las muchas aplicaciones posibles que tiene la ingeniería genética.

TÉCNICAS DE LA INGENIERÍA GENÉTICA

Las técnicas básicas de la ingeniería genética son también las técnicas básicas de la genética microbiana moderna. La mayor parte de ellas quedaron expuestas en el Capítulo 10 (*véanse* Secciones 10.12 a 10.18). La genómica y la bioinformática también han empezado a desempeñar un papel muy importante en la biotecnología (*véase* Sección 15.6). No podemos incluir aquí todas estas técnicas, pero podemos resumir algunos de sus principios fundamentales. Además, ampliaremos la descripción de algunas de las técnicas que guardan una relación más directa con la biotecnología.

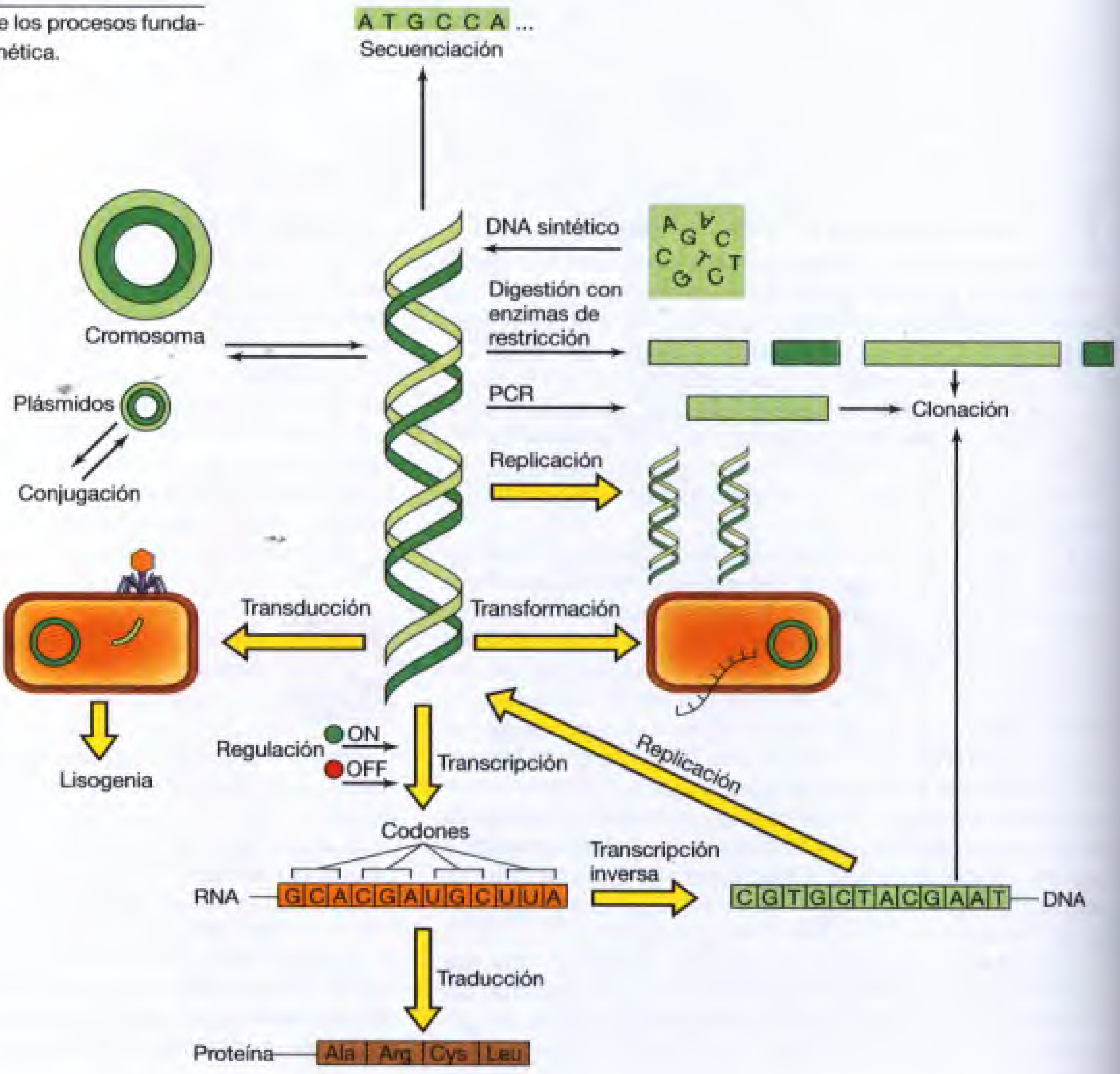
31.1 Resumen de los principios fundamentales de la ingeniería genética

La mayor parte de la ingeniería genética se basa en la *clonación molecular* (*véase* Sección 10.14). En la clonación molecular, un fragmento de DNA procedente de prácticamente cualquier tipo de elemento genético compuesto de un DNA bicatenario se recombina con un vector y se introduce en un hospedador adecuado. Los vectores de clonación que se utilizan con más frecuencia incluyen los plásmidos y los bacteriófagos (*véanse* Secciones 10.15 y 10.16). La clonación molecular se desarrolló cuando se empezaron a comprender mejor ciertos aspectos de la genética molecular. Además, en muchos casos, la aplicación biotecnológica específica no sólo depende de la capacidad para identificar y clonar un gen, sino también de la manipulación que se haga de la expresión del gen para producir, identificar y purificar la proteína.

Los siguientes avances, cuyas relaciones se esquematizan en la Figura 31.1, han sido esenciales para el desarrollo de la ingeniería genética.

1. **Química del DNA:** desarrollo de procedimientos para aislar, secuenciar y sintetizar el DNA (*véase* Sección 10.13).
2. **Enzimología del DNA:** descubrimiento de endonucleasas de restricción, DNA ligasas y DNA polimerasas (*véanse* Secciones 7.5 y 10.12).
3. **Replicación del DNA:** comprensión de los mecanismos de replicación del DNA, así como de la importancia de los vectores de clonación de DNA que son capaces de realizar una replicación independiente y del desarrollo de la **reacción en cadena de la polimerasa** (*véanse* Secciones 7.5 a 7.7 y 10.15 a 10.17).
4. **Plásmidos y conjugación:** descubrimiento de los plásmidos, y determinación de los mecanismos por los que éstos se replican y de la forma en la que algunos de ellos pueden transferirse de una célula a otra mediante conjugación (*véanse* Secciones 10.8 y 10.9).
5. **Bacteriófago atemperado:** conocimiento de la forma en la que la replicación y la integración se controlan en bacteriófagos atemperados y del modo en el que se forman fagos en la transducción especializada (*véanse* Secciones 9.10 y 10.7).
6. **Transformación:** descubrimiento de métodos para introducir DNA libre en las células (*véase* Sección 10.6).
7. **Química y enzimología del RNA:** comprensión de la forma en la que se trabaja con el RNA mensajero, así como del modo en el que se construye el mRNA eucariótico, y de la importancia del procesamiento del RNA en la formación de mRNA eucariótico maduro (*véase* Sección 7.12).
8. **Transcripción inversa:** descubrimiento de la enzima *transcriptasa inversa* en retrovirus y su desarrollo como medio para transcribir información desde el mRNA al DNA (*véanse* Secciones 9.12 y 16.14).

Figura 31.1 Resumen de los procesos fundamentales de la ingeniería genética.


A T G C C A ...
Secuenciación
DNA sintético
A G A C C T G C T
Digestión con enzimas de restricción
Cromosoma
PCR
Clonación
Plásmidos
Conjugación
Replicación
Transducción
Transformación
Lisogenia
Regulación
ON
OFF
Transcripción
Replicación
Codones
Transcripción inversa
RNA
G C A C G A U G C U U A
C G T G C T A C G A A T
DNA
Traducción
Proteína
Ala Arg Cys Leu

9. **Regulación:** comprensión de los factores implicados en la regulación de la transcripción, incluido el descubrimiento de sitios del promotor y control del operón (*véanse* Secciones 7.8 a 7.11 y Capítulo 8).
10. **Traducción:** conocimiento de los pasos implicados en la traducción, así como de la importancia de los sitios de unión a los ribosomas del mRNA, del papel desempeñado por el codón de iniciación y de la importancia de un marco de lectura apropiado (*véase* Sección 7.15).
11. **Química de las proteínas:** desarrollo de métodos para aislar, purificar, valorar y secuenciar las proteínas.
12. **Secreción y modificación postraduccional de las proteínas:** conocimiento del mecanismo mediante el que se forman proteínas con secuencias señal que se eliminan durante o después de la secreción (*véase* Sección 7.16). Descubrimiento de otros tipos de modificación postraduccional de proteínas.
13. **Código genético:** esclarecimiento del código genético y determinación de que era el mismo en casi todos los organismos, aunque ciertos codones se utilizaron con menos frecuencia en unos que en otros (*véase* Sección 7.13).

✓ *31.1 Revisión de conceptos*

Las técnicas de la ingeniería genética se basan en descubrimientos fundamentales en los sectores de la genética molecular y la bioquímica. El éxito de la ingeniería genética depende no sólo de la capacidad para llevar a cabo una clonación molecular, sino también del conocimiento que se tenga de los mecanismos de replicación, transcripción y traducción.

✓ ¿Qué es un *vector de clonación*?

✓ ¿Qué enzimas se encuentran implicadas en la técnica conocida como *PCR?*

31.2 Hospedadores para vectores de clonación

Cuando presentamos las técnicas genéticas *in vitro* en el Capítulo 10, nos referimos sobre todo al análisis genético de *Bacteria*. El objetivo era, pues, comprender el organismo objeto de estudio. Frente a esto, en la biotecnología se pretende utilizar la ingeniería genética para un fin comercial específico, como puede ser la producción eficaz de grandes cantidades de una proteína concreta, la creación de una nueva vacuna, o la introducción de un gen específico en una planta o un animal. En todos estos casos es esencial tener en cuenta el *hospedador* que va a utilizarse, pues también determinará la elección de un vector.

Si lo que se desea es sólo obtener grandes cantidades de DNA clonado, las características ideales de un hospedador son el crecimiento rápido, la capacidad para crecer en un medio de cultivo barato, la ausencia de potencial nocivo o patógeno, la capacidad para absorber el DNA y la estabilidad en el cultivo. El hospedador debe disponer de las enzimas necesarias para permitir la replicación del vector. Los hospedadores más útiles para la clonación suelen ser microorganismos que crecen bien y de los que se tiene tanto la información genética como las herramientas necesarias para manipularlos genéticamente. Tal es el caso de las bacterias *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, o de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. No obstante, muchas cuestiones científicas básicas sólo se pueden responder si el DNA clonado puede ser devuelto a las especies del organismo a partir de los que se originó. Esto sucede sobre todo en los estudios que implican una regulación genética. Por último, si el propio DNA recombinante va a utilizarse terapéuticamente para tratar enfermedades humanas, el hospedador debe ser una persona humana.

Hospedadores procarióticos

Aunque la mayor parte de la clonación molecular se ha realizado en *Escherichia coli*, existen algunos inconvenientes para utilizar este hospedador. *Escherichia coli* presenta ciertos peligros en la producción a gran escala de productos derivados del DNA clonado, puesto que se encuentra en el tracto intestinal humano y las cepas del tipo silvestre son potencialmente patógenas. Por otro lado, incluso las cepas que no son patógenas producen endotoxinas que pueden contaminar los productos, lo que supone un grave inconveniente para los fármacos inyectables. Por último, *E. coli* retiene proteínas extracelulares en el espacio periplásmico, lo que dificulta potencialmente las labores de aislamiento y purificación. De todos modos se han desarrollado cepas de *E. coli* en las que se ha eliminado la mayor parte de estos problemas. Así, y debido sobre todo al amplio conocimiento que se tiene de su genética y de su bioquímica, *E. coli* sigue siendo el organismo de elección para la mayoría de los estudios de clonación.

El organismo Gram positivo *Bacillus subtilis* también puede utilizarse como hospedador. *B. subtilis* no tiene potencial patógeno, no produce endotoxinas y secreta proteínas al medio. Aunque la tecnología para realizar una clonación en *B. subtilis* no está ni con mucho tan bien desarrollada como la de *E. coli*, se han desarrollado plásmidos y fagos aptos para la clonación, y la transformación es un procedimiento bien conocido en *B. subtilis*. Sin embargo, existen ciertos inconvenientes para la utilización de *B. subtilis* como hospedador de una clonación. Así, la inestabilidad de los plásmidos sigue siendo un problema sin resolver, lo que hace que sea difícil mantener la replicación de los plásmidos durante muchas transferencias del cultivo. Además, el DNA foráneo no se mantiene bien en las células de *B. subtilis*, por lo que con frecuencia el DNA clonado se pierde de forma inesperada. En fin, la adaptación de una bacteria para su uso como hospedador en experimentos de clonación no siempre es sencilla.

Con frecuencia, los organismos utilizados como hospedadores de clonación deben tener genotipos específicos para resultar eficaces. Por ejemplo, si el vector lleva el gen de la β-galactosidasa (*véanse* Secciones 10.16 y 15.1), el hospedador debe tener una mutación que desactive este gen. Dado que M13 infecta sólo bacterias con pili F (*véanse* Secciones 10.8 y 16.3), los hospedadores utilizados con vectores derivados de M13 contienen el plásmido F. Estos factores y otros, tales como la capacidad para seleccionar los transformantes, deben tenerse en cuenta siempre, independientemente de si el hospedador es procariótico o eucariótico.

Hospedadores eucarióticos

La clonación en *microorganismos eucarióticos* presenta algunos usos importantes, sobre todo cuando se trata de comprender los detalles de la regulación genética en sistemas eucarióticos. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es el más conocido desde el punto de vista genético y se usa en muchos ámbitos como hospedador de clonación. Se han desarrollado para la levadura algunos plásmidos vectores, así como diversos YACs (*véase* Sección 15.1).

Para muchas aplicaciones, sería deseable la clonación de genes en *células de mamífero*. Los sistemas de cultivo de células de mamífero pueden manipularse en ciertos aspectos del mismo modo que los cultivos microbianos y se utilizan ampliamente en las investigaciones sobre genética humana, así como en estudios sobre el cáncer, enfermedades infecciosas y fisiología.

Una de las ventajas más importantes que presenta el uso de células eucarióticas como hospedadores de clonación consiste en que ya poseen el RNA complejo y los sistemas de procesamiento postraduccional que se encuentran implicados en la producción de productos génicos en organismos superiores, por lo que no tienen que ser sometidos a ingeniería genética dentro del vector, como sucede cuando la fabricación del producto deseado se lleva a cabo en un hospedador procariótico (el procesamiento postraduccional, sobre todo, puede ocasionar ciertos problemas de clonación molecular; *véase* Sección 31.5).

Por otro lado, el uso de células humanas como hospedadores presenta el inconveniente de que son caras y difíciles de producir a gran escala. Además, los niveles de expresión de los genes clonados suelen ser bajos. Las líneas de células de insectos son más sencillas de cultivar, por lo que se han desarrollado vectores a partir de DNA de virus que atacan a los insectos, a saber, los baculovirus (*véase* Sección 31.4).

Por supuesto, para muchas aplicaciones es importante que el hospedador eucariótico sea una célula vegetal o una planta. De hecho, existe un gran número de aplicaciones para plantas agrícolas en donde se realizan experimentos genéticos (*véase* Sección 31.7). Es necesario que el hospedador sea capaz de absorber el DNA. Ya hemos explicado anteriormente la metodología que debe seguirse para lograr esto (*véase* Sección 10.6), por lo que a continuación volveremos nuestra atención a los hospedadores eucarióticos.

Transformación (transfección) de células eucarióticas

Los microorganismos eucarióticos, y las células animales y vegetales pueden absorber DNA en un proceso que se parece al de la transformación bacteriana. Como al hablar de células de mamíferos la palabra *transformación* se utiliza para describir la conversión de células en un estado maligno, a saber, tumoroso o canceroso (*véase* Sección 9.11), a la introducción de DNA en células de mamíferos se le ha dado el nombre de *transfección* (un término que tiene otro significado en los sistemas bacterianos; *véase* descripción anterior).

La transfección de células animales cultivadas se realizaba en un principio mediante la precipitación de DNA, de forma que las células lo absorbieran por fagocitosis (*véase* Sección 22.2), puesto que no tienen paredes celulares. En las levaduras, que representan un organismo muy importante para los estudios de ingeniería genética, la transfección de baja eficacia puede mediarse con diversos métodos que consisten en fomentar una competencia artificial. Sin embargo, al igual que ocurre en el caso de los procariotas, la *electroporación* (*véase* Sección 10.6) se aplica cada vez más a todos los tipos de células eucarióticas y puede utilizarse independientemente de si se ha eliminado o no la pared celular.

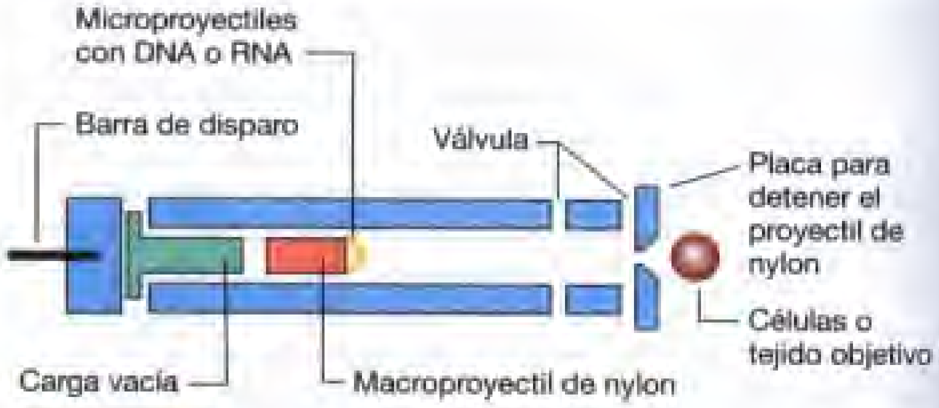

Microproyectiles con DNA o RNA
Barra de disparo
Válvula
Placa para detener el proyectil de nylon
Células o tejido objetivo
Carga vacía
Macroproyectil de nylon

Figura 31.2 Disparador de ácido nucleico para la transfección de ciertas células eucarióticas. Los mecanismos internos del disparador muestran la forma en la que los ácidos nucleicos, acoplados en perdigones de metal, se proyectan hacia las células objetivo.

Además de la electroporación, se ha desarrollado un «arma» de microproyectiles a alta velocidad para incorporar DNA a las células. Este original **disparador de partículas** funciona en cierto modo como un arma de fuego convencional. Un pequeño cilindro de acero que contiene una carga de pólvora se utiliza para disparar partículas recubiertas de ácido nucleico a las células objetivo (Figura 31.2). Las partículas bombardean la célula y perforan las paredes y las membranas celulares, si bien sin aniquilar la célula realmente. El ácido nucleico que entra en las células puede recombinarse a continuación con el DNA hospedador. El disparador de partículas se ha utilizado con éxito para realizar transfecciones en levaduras, algas, una gran variedad de células vegetales, e incluso mitocondrias y cloroplastos. El arma de partículas resulta muy útil puesto que, a diferencia de lo que ocurre con la electroporación, puede utilizarse en tejido intacto, como son las semillas vegetales. Por último, en las células animales el DNA puede inyectarse en el núcleo utilizando micropipetas, con una técnica que recibe el nombre de *microinyección*.

✓ 31.2 Revisión de conceptos

La clonación molecular requiere de una célula o un organismo que sirva como hospedador para el DNA. En biotecnología, la selección de un hospedador depende de la aplicación final. En muchos casos, el hospedador puede ser un organismo procariótico, pero en otros es imprescindible que el hospedador sea eucariótico. Para servir como hospedador, es necesario que la célula o el organismo absorban DNA, y esto puede realizarse mediante una gran variedad de técnicas.

- ✓ ¿Por qué se necesita un hospedador para la clonación molecular?
- ✓ Describa tres mecanismos mediante los que las células pueden absorber DNA.

31.3 Búsqueda del clon idóneo

La práctica de la ingeniería genética suele comenzar con el aislamiento de un clon que contiene el gen de interés. En un apartado posterior de este capítulo describiremos diversas clases de manipulación que pueden realizarse en este gen, dependiendo de la aplicación particular que vaya a desarrollarse con su uso. En este punto, comenzaremos tratando algunas de las formas que pueden utilizarse para identificar el clon original.

Para clonar el DNA puede utilizarse una gran variedad de métodos. Por ejemplo, es posible crear bibliotecas de genes (genotecas) a partir de un DNA genómico total (*véase* Sección 10.14), o simplemente clonar un fragmento de DNA mediante la PCR (*véase* Sección 10.17). Por lo general, las clonaciones a partir de productos PCR se realizan cuando el gen de interés ya se ha identificado y el objetivo es tan sólo obtener un clon simple. Sin embargo, en una genoteca hay miles o decenas de miles de clones y, por lo general, sólo uno o unos cuantos pueden ser el gen de interés. Hasta ahora, hemos descrito las formas en las que pueden seleccionarse los hospedadores que contienen un plásmido eligiendo un marcador del vector, como puede ser la resistencia a los antibióticos, de manera que sólo estas células formen colonias (*véase* Sección 10.15). En el caso de las células hospedadoras que contienen un vector vírico, basta con buscar placas (*véase* Sección 10.16). También hemos descrito la forma en la que estas colonias o placas pueden examinarse para buscar vectores que contengan insertos de DNA foráneo mediante la búsqueda de la inactivación de un gen del vector (*véanse* Figuras 10.42 y 15.1). Si se está clonando un solo fragmento de DNA generado por la PCR o purificado mediante cualquier medio, estas simples elecciones o escrutinios deberían ser suficientes; sin embargo, si se está utilizando un conjunto muy heterogéneo de fragmentos de DNA, como sucede en la formación de genotecas, la identificación de las células que llevan el DNA clonado es tan sólo el primer paso. Es entonces cuando llega el gran reto: *encontrar el clon* que lleva el gen que interesa. Debe haber procedimientos para examinar las colonias de bacterias o las placas de células infectadas que están creciendo sobre placas de agar, así como para detectar las pocas que contienen el gen de interés. El objetivo de esta sección consiste en describir los métodos posibles que pueden llevarnos a encontrar el clon idóneo. En primer lugar consideraremos la situación en la que el gen *se expresa* (es decir, en el que la proteína se sintetiza) en el hospedador de clonación. A continuación, veremos la situación, bastante habitual, en la que el gen no se expresa y es preciso buscar el propio DNA.

Si el gen foráneo se expresa en el hospedador de clonación

Si el gen foráneo se expresa (es decir, la proteína se sintetiza) en el hospedador de clonación, puede utilizarse procedimientos para buscar la presencia de esta proteína en las colonias recombinantes. El hospedador de clonación *no* debe producir la proteína objeto de estudio. Si estamos buscando clones que expresen el gen, entonces estamos buscando las pocas colonias en las que esta proteína está presente. Si la proteína es una de las que produce normalmente el hospedador de clonación, esto significa que el hospedador debe de tener un defecto, es decir, una mutación en el gen de interés. En este caso, cuando el gen foráneo se incorpora, la expresión de este gen foráneo puede determinarse mediante complementación (*véase* Sección 10.10). Si se necesita esta función, puede *seleccionarse* un clon complementario, lo que facilitará considerablemente el proceso. Es evidente que si el hospedador ya expresaba una proteína con la misma actividad, habrá muchos antecedentes de esta actividad, por lo que no podrá detectarse la proteína producida a través del gen foráneo. Si la proteína no se produce normalmente en la bacteria hospedadora, es posible que el hospedador tenga un defecto natural. En algunos casos, estas actividades nuevas se expresan y pueden detectarse. Un ejemplo patente es la clonación de luciferasa en *Escherichia coli*, que hace que las colonias que contienen dichos clones reluzcan en la oscuridad (*véase* Figura 8.22).

Anticuerpos como método para detectar la proteína

Si la proteína no tiene una función que pueda detectarse con facilidad, se necesita seguir un método distinto, que implica el uso de un anticuerpo como reactivo específico para la proteína de interés. En el Capítulo 22 hablamos de los anticuerpos y la inmunología. Como se recordará, un anticuerpo es una proteína del suero producida por el sistema de un mamífero que se combina de un modo altamente específico con otro proteína, a saber, el *antígeno* (*véase* Sección 22.4). En el caso que nos ocupa, la proteína del gen clonado es el antígeno, y esta proteína se utiliza para producir un anticuerpo en un animal de experimentación. Como el anticuerpo se combina de forma específica con el antígeno, cuando el antígeno está presente en una o más colonias de la placa, las ubicaciones de estas colonias pueden determinarse observando la fijación del anticuerpo. Como sólo una pequeña cantidad de la proteína (el antígeno) está presente en las colonias, sólo se fija una pequeña cantidad del anticuerpo, lo que significa que debe existir un procedimiento altamente sensible para detectar el anticuerpo fijado. En la práctica, esto se consigue utilizando un sistema que utiliza un agente radioactivo, un agente que transmite luz o un agente con una enzima específica acoplada. La reactividad o la luz pueden detectarse mediante una autorradiografía, utilizando una película para rayos X. Las enzimas que suelen utilizarse con más frecuencia convierten un sustrato incoloro en uno de color, cuya observancia puede medirse con gran sensibilidad. De todos modos, en apartados anteriores ya hemos hablado de estas y otras técnicas extremadamente sensibles para detectar antígenos (*véanse* Secciones 24.7 y 24.12).

Téngase en cuenta que este método de detección implica un *escrutinio o rastreo*, y no una selección, lo que significa que es preciso examinar miles de clones. Éstos pueden incluir colonias que contengan plásmidos o placas con virus que produzcan el producto clonado. Todo el procedimiento en su conjunto, utilizando plásmidos y una detección radiactiva, se esquematiza en la Figura 31.3*a*. Como puede verse, el procedimiento de réplica en placa (*véase* Figura 10.2) se utiliza para crear un duplicado de la placa patrón, pero la duplicación se hace sobre un filtro de membrana y todas las manipulaciones se hacen con ese filtro. Una vez que las colonias

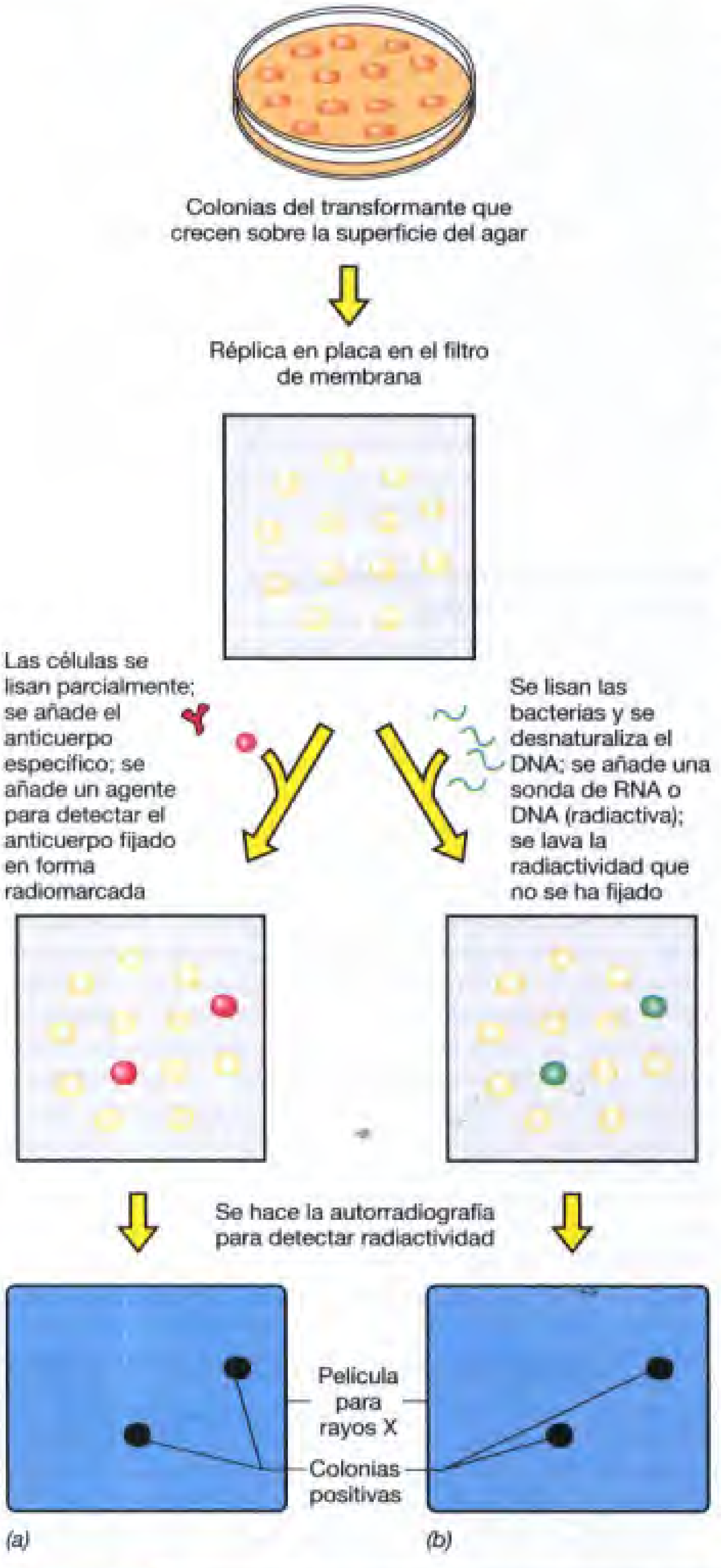

Colonias del transformante que crecen sobre la superficie del agar
Réplica en placa en el filtro de membrana
Las células se lisan parcialmente; se añade el anticuerpo específico; se añade un agente para detectar el anticuerpo fijado en forma radiomarcada
Se lisan las bacterias y se desnaturaliza el DNA; se añade una sonda de RNA o DNA (radiactiva); se lava la radiactividad que no se ha fijado
Se hace la autorradiografía para detectar radiactividad
Película para rayos X
Colonias positivas
(a)
(b)

Figura 31.3 Búsqueda del clon idóneo. (a) Método para detectar la producción de proteína mediante el uso de un anticuerpo específico. (b) Método para detectar los clones recombinantes mediante la hibridación de una colonia por una sonda radiactiva de ácido nucleico. Aunque ambas partes de la figura muestran un método de detección que implica el uso de radiactividad, hoy en día se están empleando muchos otros tipos de sistemas de detección no radiactiva.

duplicadas han crecido, se lisan para liberar la proteína (antígeno) de interés (el escrutinio para ver la expresión en vectores fágicos elimina este paso, puesto que las bacterias ya están lisadas). Acto seguido, se añade el anticuerpo y se deja que tenga lugar la reacción anticuerpo-antígeno. El anticuerpo no fijado se lava a continuación y, después, se añade un agente radioactivo que es específico para el anticuerpo. Se coloca sobre el filtro un trozo de película para rayos X y se deja expuesto. Si hay una colonia radiactiva, se observará una mancha al revelar la película para rayos X. La ubicación de esa mancha sobre la película corresponde a la ubicación en la placa patrón de la colonia que produce la proteína. Esta colonia puede tomarse de la placa patrón y cultivarse.

Una de las limitaciones de este procedimiento consiste en que debe haber un anticuerpo que sea *específico* para la proteína en cuestión. Como ya vimos en el Capítulo 22, el anticuerpo puede producirse fácilmente inyectando la proteína (el antígeno) en un animal, pero la proteína inyectada debe estar pura; de lo contrario, se formará más de un anticuerpo. Por lo tanto, es preciso haber purificado previamente la proteína.

Sondas de ácido nucleico: búsqueda del gen en cuestión

Supongamos que el gen no se expresa en el hospedador de clonación o que no existe ningún ensayo o anticuerpo para el producto génico, ¿cómo puede detectarse la presencia de éste en las colonias? El procedimiento más habitual consiste en utilizar una **sonda de ácido nucleico** que contenga una parte importante de la secuencia básica del gen de interés. Como ya hemos visto anteriormente (*véase* Sección 10.12), la hibridación del ácido nucleico puede utilizarse como medio específico para detectar polinucleótidos con secuencias específicas. Tanto el DNA como el RNA pueden utilizarse como sonda. El método habitual consiste en marcar la sonda de ácido nucleico, a menudo con fosfato radioactivo, aunque cada vez se utilizan más las técnicas sin isótopos, que permiten que una sonda monocatenaria se hibride con ácido nucleico monocatenario derivado del DNA clonado. Debido al hecho de que el apareamiento se realiza entre las bases complementarias, dos polinucleótidos monocatenarios sólo se hibridarán si son complementarios en un alto porcentaje.

En la Figura 31.3*b* se muestra la forma en la que una sonda de ácido nucleico puede utilizarse para detectar la presencia de DNA recombinante en colonias. El procedimiento, denominado **hibridación de colonias,** hace uso de nuevo de la réplica en placa para producir un duplicado de la placa patrón sobre el filtro de membrana (este mismo procedimiento puede llevarse a cabo con vectores víricos transfiriendo las placas sobre una membrana). Las células del filtro se lisan para liberar el ácido nucleico, y para convertir el DNA en una forma monocatenaria y fijarlo al filtro. Acto seguido, se trata este filtro con una sonda radiactiva de ácido nucleico (ya sea RNA o DNA) para permitir la hibridación y, tras eliminar el ácido nucleico radioactivo no fijado, el filtro se somete a una autorradiografía. Una vez revelada, la película para rayos X se examina para comprobar si hay manchas. En caso de haberlas, éstas corresponderán a las ubicaciones de la membrana en las que la sonda radiactiva se ha hibridado con DNA de una colonia concreta. Las colonias que corresponden a estas manchas se recogen a continuación para seguir estudiándolas. Se ha desarrollado una modificación de este procedimiento que evita el uso de la sonda radiactiva y tiene su ámbito de aplicación en la microbiología química (*véase* Sección 24.13).

✓ *31.3 Revisión de conceptos*

Se necesitan procedimientos especiales para detectar el gen foráneo en el hospedador de clonación. Si el gen se expresa, la presencia de la proteína en cuestión, que se detecta por su actividad o por su reacción con anticuerpos específicos, es una prueba de que el gen está presente. Sin embargo, si el gen no se expresa, su presencia puede detectarse mediante el uso de una sonda de ácido nucleico.

- ✓ ¿Depende el uso de sondas de ácido nucleico de la expresión del gen? Explique este hecho.
- ✓ ¿Por qué es necesario lisar células que contienen plásmidos con el fin de detectar el producto del gen clonado?

31.4 Vectores especializados

Si el propósito de la clonación de un gen consiste en conseguir un alto nivel de su expresión en un hospedador adecuado, basta con localizar una copia clonada del gen. Al igual que se han desarrollado vectores especializados para trabajar con fragmentos grandes de DNA, tales como los cromosomas artificiales bacterianos y los cromosomas artificiales de levaduras (BACs y YACs, *véase* Sección 15.1), también se han desarrollado vectores especializados para su uso como herramientas específicas en el campo de la biotecnología.

Por ejemplo, existen los *vectores lanzadera*, que permiten que el DNA clonado se mueva entre organismos no relacionados. Un **vector lanzadera** es un vector de clonación que puede replicarse de forma estable en dos organismos distintos. Se han desarrollado vectores lanzadera que pueden replicarse tanto en el par formado *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* como en el de *E. coli* y la levadura, en el de *E. coli* y diversas células de mamíferos, y en muchos otros pares de organismos.

Para muchos propósitos, los vectores de clonación que facilitan la *expresión* del DNA clonado son aún más importantes que los vectores lanzadera. Los organismos tienen sistemas reguladores complejos (*véase* Capítulo 8), por lo que podríamos esperar que muchos genes clonados no se expresaran, al menos no de forma eficaz, en un hospedador foráneo; sin embargo, este obstáculo puede salvarse mediante el uso de *vectores de expresión*. Un **vector de expresión** es un vector que no sólo puede utilizarse para clonar un gen deseado, sino que además contiene las secuencias reguladoras necesarias para que la expresión del gen pueda someterse a la manipulación experimental. En la regulación de la expresión del gen existen muchos factores importantes, pero uno de los fundamentales es la regulación de la transcripción.

Regulación de la transcripción de los vectores de expresión

Uno de los elementos más importantes de un vector de expresión es un sistema que permita la transcripción del gen clonado. Por lo general, también es importante que la transcripción se controle de forma muy estrecha. Para niveles de expresión muy altos, es esencial producir altos niveles de mRNA. La región promotora es el sitio en el que ocurre por primera vez la fijación de la RNA polimerasa (*véase* Sección 7.9). En el caso de las *Bacteria*, la región del DNA que se encuentra en torno a los nucleótidos 10 y 25 antes del comienzo de la transcripción —las llamadas regiones −10 y −35— (*véase* Figura 7.27) resulta especialmente importante en el promotor. El promotor nativo del DNA clonado puede funcionar de una forma muy débil o no funcionar en absoluto en el nuevo hospedador. Los promotores procedentes de eucariotas y de otros procariotas funcionan de forma débil o no funcionan en absoluto en *Escherichia coli*. Incluso algunos promotores de *Escherichia coli* funcionan a niveles bajos en *Escherichia coli* debido a que sus secuencias no están cerca de la secuencia de consenso (*véase* Sección 7.9). Por esta razón, el vector de expresión debe contener un promotor que funcione de forma eficaz en el hospedador y otro que se encuentre correctamente colocado, de forma que permita la transcripción del gen clonado. Los promotores de *Escherichia coli* que se han utilizado en la construcción de los vectores de expresión incluyen *lac* (el promotor del operón *lac*), *trp* (el promotor del operón *trp*), *tac* y *trc* (híbridos sintéticos de los promotores *trp* y *lac*), y lambda P_L (la región izquierda del promotor lambda; *véase* Sección 9.10). Téngase en cuenta que estos promotores pueden regularse (*véanse* Secciones 8.5 y 9.10).

En casi todos los casos es muy importante ser capaz de regular la expresión del gen clonado; es decir, aunque normalmente es necesario producir niveles muy altos de mRNA (así como traducirlos), por lo general no se desea diseñar un vector que permita que el gen se transcriba a altos niveles en todas las ocasiones. Efectivamente, algunas proteínas que tienen un interés comercial significativo resultan tóxicas para el hospedador, por lo que puede ser importante que el gen no se transcriba en absoluto en las primeras etapas de crecimiento del cultivo. La situación ideal consiste en ser capaz de hacer crecer el cultivo que contiene el vector de expresión hasta obtener una gran cantidad de células, cada una de las cuales contenga un gran número de copias del vector para, a continuación, modificar la expresión en todas las copias al mismo tiempo mediante la manipulación del interruptor regulador. Por lo tanto, la transcripción necesita regularse de una forma muy estrecha.

En el Capítulo 8 presentamos los controles reguladores de la expresión del gen. Recuérdese la importancia esencial que tenía el sistema represor-operador a la hora de regular la transcripción génica (*véase* Sección 8.5). Un represor fuerte puede bloquear completamente la síntesis de las proteínas que tiene bajo su control uniéndose a la región del operador. La función del represor puede detenerse en el momento que se desee añadiendo un inductor, lo que permitirá la transcripción de los genes controlados por el operador.

Para que el sistema represor-operador funcione como un interruptor regulador de la producción de una proteína foránea, el vector de expresión debe contener el operador controlado por el represor al que está unido el gen clonado. Esto permite la disposición adecuada de la secuencia de los elementos genéticos: promotor-operador-sitio de unión del ribosoma-gen estructural, de manera que tenga lugar una transcripción y una traducción eficaces. En la mayor parte de los casos, el operador y el promotor se corresponden entre sí (por ejemplo, el operador *lac* se utiliza con el promotor *lac*), si bien esto no ocurre en todos los casos. Así, se puede construir fácilmente un vector que contenga el promotor *trp* bajo el control del operador *lac*.

En los vectores que usan el operador *lac*, el promotor se pone en funcionamiento mediante inductores, tales como la lactosa o los β-galactósidos relacionados (*véase* Sección 8.5). De este modo, el crecimiento de la célula y la síntesis de las proteínas pueden ponerse en fase haciendo que el crecimiento transcurra en ausencia de un inductor hasta conseguir una densidad de células adecuada y, a continuación, añadiendo un inductor para llevar a cabo la síntesis de las proteínas deseadas. Si el vector contiene un gran número de copias de la célula (*véase* Sección 10.8), el nivel normal del represor codificado por el gen cromosómico puede no ser adecuado para evitar que el promotor funcione. La Figura 31.4 muestra un vector de expresión que utiliza el promotor *trc* bajo el control del operador *lac* (*lacO*). Este plásmido también contiene una copia del gen *lacI* que codifica el represor *lac*. El nivel del represor de la célula que contiene este plásmido resulta suficiente para impedir la transcripción del promotor *trc* hasta que se añada el inductor.

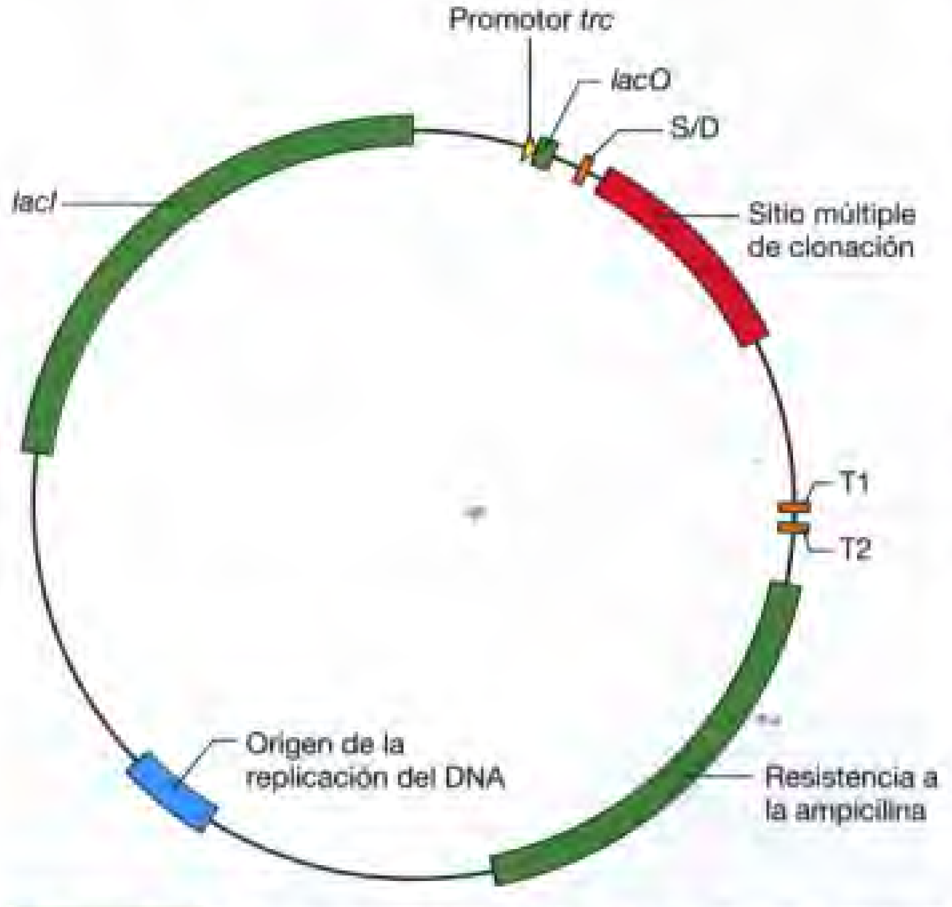

Promotor *trc*
lacO
S/D
lacI
Sitio múltiple de clonación
T1
T2
Origen de la replicación del DNA
Resistencia a la ampicilina

Figura 31.4 Mapa genético parcial del vector de expresión pSE420. Este vector es comercializado por Invitrogen Corp., una empresa dedicada a la ingeniería genética. El sitio múltiple de clonación (*polylinker*) es un sitio que contiene secuencias distintas de reconocimiento de enzimas de restricción, lo que tiene por objeto facilitar la clonación (*véase* Sección 10.15). Esta región (y el gen clonado) sería transcrita por el promotor *trc*, que se encuentra inmediatamente encima del operador *lac* (*lacO*). Inmediatamente encima del sitio múltiple de clonación se encuentra una secuencia que codifica un sitio Shine-Dalgarno que tiene el mRNA resultante (*véase* Sección 7.15). Debajo del sitio múltiple de clonación hay dos terminadores de transcripción (T1 y T2). El plásmido también contiene el gen *lacI*, que codifica el represor *lac*, y un gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina. Estos dos genes se encuentran bajo el control de sus propios promotores, que no se muestran.

Controles de transcripción de bacteriófagos

Los vectores que utilizan el promotor P_L del bacteriófago lambda (y el operador correspondiente O_L) están controlados porque tienen el represor de la proteína de lambda en la célula (*véase* Sección 9.10). Por lo general, el represor lambda está codificado por un gen mutante (que lleva el vector o un profago del hospedador) y es sensible a la temperatura. Al elevar la temperatura del cultivo al valor adecuado (generalmente entre 8°C y 10°C por encima de la temperatura de crecimiento), el represor lambda se desactiva y comienza la transcripción a partir de P_L.

En algunos casos, el sistema de control utilizado puede no ser una parte habitual del hospedador en absoluto. Un ejemplo excelente de esto es el uso del promotor y de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 como sistema regulador de un vector de expresión. Cuando T7 infecta *Escherichia coli*, codifica su propia RNA polimerasa, que reconoce únicamente promotores de T7 y, por lo tanto, bloquea la transcripción del hospedador (*véase* Sección 16.4). En los vectores de expresión es posible colocar la expresión de los genes clonados bajo el control de un promotor de T7. Sin embargo, cuando se hace esto, es necesario utilizar ingeniería para introducir también en el plásmido el gen de la RNA polimerasa de T7; esta última se coloca bajo el control de un promotor que se regula fácilmente, como puede ser el del fago lambda o el de *lac*. La expresión del gen o los genes clonados se produce poco después de activar la transcripción de la RNA polimerasa de T7. Como sólo reconoce promotores de T7, la RNA polimerasa de T7 transcribe únicamente los genes clonados; todos los demás genes quedan sin transcribir. Dado que ese sistema es tremendamente potente y específico, la inducción del sistema formado por el promotor y la RNA polimerasa de T7 hace que el hospedador deje de crecer.

Además de un promotor fuerte que pueda regularse, la mayor parte de los vectores de expresión contiene un terminador de transcripción eficaz. De esta manera se impide la transcripción del vector completo, puesto que esto podría interferir en la estabilidad del vector. El vector de expresión que se muestra en la Figura 31.4 tiene terminadores de transcripción fuertes para detener la transcripción que tiene lugar debajo del gen clonado. Además, la estructura secundaria de algunos terminadores de transcripción parece aumentar la estabilidad del mensaje (*véase* Sección 7.10). Así, no sólo es importante crear grandes cantidades de mRNA a partir del gen clonado, sino también garantizar que este mRNA es lo más estable posible.

Traducción del gen clonado

Los vectores de expresión también deben diseñarse de tal forma que se garantice que el mRNA producido se traduzca de forma eficaz. Con el fin de sintetizar una proteína a partir de un mRNA, es esencial que los ribosomas se unan en el sitio correcto y empiecen a leer en el marco correcto. En los procariotas, esto se logra cuando el mRNA tiene un sitio de unión de los ribosomas (la secuencia de Shine-Dalgarno) (*véase* Sección 7.15) y, cerca de él, un codón de iniciación. Los sitios de unión de los ribosomas que hay en las bacterias no se encuentran en los genes eucarióticos y, por ello, es imprescindible que la región bacteriana esté presente en el vector si se desea obtener altos niveles de expresión genética. Una vez más, el vector mostrado en la Figura 31.4 tiene este sitio. Para que se produzca un adecuada unión a los ribosomas, es necesario que exista una distancia adecuada entre el sitio de unión del ribosoma y el codón de iniciación de la traducción. Si estos sitios están demasiado cerca o demasiado separados, el gen se producirá con baja eficacia. En algunos casos, el codón de iniciación del gen que va a clonarse forma parte del vector de expresión. Resulta curioso que la traducción sea a veces más eficaz si el gen clonado es el segundo gen en un mRNA bicistrónico, fenómeno que recibe el nombre de *acoplamiento traduccional*. El gen que se encuentra arriba codifica con frecuencia un péptido pequeño, que se degrada con rapidez.

Con frecuencia, es preciso hacer ajustes para garantizar una traducción eficaz *después de* que el gen haya sido clonado. Por ejemplo, es importante que el sitio de Shine-Dalgarno citado antes no se encuentre en una región de estructura secundaria, pero esto no siempre puede predecirse antes de conocer la secuencia del gen clonado. En fin, el *uso de codones* presenta dificultades en algunos casos.

Existe más de un codón para la mayor parte de los veinte aminoácidos (*véase* Tabla 7.3), y algunos codones se utilizan con más frecuencia que otros. Esta preferencia puede variar considerablemente de unos organismos a otros. El uso de codones depende en parte de la concentración del tRNA adecuado que haya en la célula. Por lo tanto, un gen cuyo patrón de uso de codones sea considerablemente distinto del que presenta el nuevo hospedador se producirá probablemente con poca eficacia. La inserción de los codones apropiados también es difícil en este caso, puesto que habría que cambiarlo en todas las ubicaciones del gen. De todos modos, en caso necesario esto puede realizarse utilizando DNA sintético y mutagénesis dirigida (*véanse* Secciones 10.13 y 10.18) para crear un gen más en consonancia con los patrones de uso de los codones del hospedador.

Por último, si el gen clonado contiene intrones (*véase* Sección 7.12), no será posible construir la proteína correcta si el hospedador es un organismo procariótico. También en este caso el problema puede corregirse mediante el uso de DNA sintético o mutagénesis dirigida, aunque existen otros métodos para crear genes sin intrones (*véase* Sección 31.5).

Vectores eucarióticos

Hasta ahora nos hemos referido a los vectores que se replican en *Bacteria*. Sin embargo, con frecuencia resulta deseable clonar y expresar genes en eucariotas. También aquí existe una gama de vectores de clonación más o menos amplia.

En un capítulo anterior describimos brevemente el uso de vectores de clonación de YAC de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para clonar fragmentos de DNA muy grandes (*véase* Sección 15.1). Sin embargo, también existen muchos otros vectores para realizar la clonación en las levaduras. La levadura es uno de los pocos eucariotas que tiene un plásmido, denominado *círculo de 2 micrones* (círculo de 2μ) debido a su tamaño, en el que están basados muchos vectores de levadura. Aunque la levadura es un organismo extremadamente útil tanto para los estudios de genética como para las aplicaciones comerciales, con frecuencia es útil utilizar otros eucariotas como hospedadores de un DNA clonado. Así, se han desarrollado vectores de clonación para muchos eucariotas diferentes, que incluyen algunas plantas (*véase* Sección 31.7).

La mayor parte de los vectores utilizados en los eucariotas superiores son vectores víricos. El virus SV40, con DNA (*véase* Sección 16.10), un virus que causa tumores en primates, se ha desarrollado como vector de clonación en líneas de cultivos de tejido humano. Se han desarrollado derivados del SV40 que no provocan tumores para clonar genes de mamíferos y, además, para conseguir la expresión de estos genes. De esta manera, el SV40 y otros vectores de clonación de mamíferos están resultando muy útiles para comprender los mecanismos implicados en la expresión genética de estos organismos complejos.

Existen vectores de mamíferos que utilizan *adenovirus* (*véase* Sección 16.13) y *virus de la vacuna* (*véase* Sección 16.12). Los vectores de los virus de la vacuna se han usado en el desarrollo de nuevas vacunas (*véase* Sección 31.6). Además, también se ha desarrollado una gran variedad de vectores de expresión eucarióticos, que son fundamentalmente de dos clases. Una de ellas está diseñada para producir una proteína concreta para fines comerciales. Los vectores derivados del *baculovirus*, un virus con DNA que se replica en las células de los insectos, pueden utilizarse para producir grandes cantidades de productos de genes clonados.

Por otro lado se han desarrollado vectores de expresión que permiten que el gen clonado se mantenga estable y se exprese en un organismo o un tejido. Estos **vectores de integración** presentan, evidentemente, un número de copias muy reducido (por lo general, una copia por genoma) y se han desarrollado en eucariotas que abarcan desde la levadura hasta las células de los mamíferos, así como en algunos procariotas. Los vectores de integración presentan usos en la investigación básica y en aplicaciones tales como la terapia génica (*véase* Sección 31.8). Los *retrovirus* (*véanse* Secciones 9.12 y 16.14) pueden utilizarse para introducir genes en células de mamíferos, puesto que estos virus se replican a través de una forma de DNA que queda integrada en el cromosoma del hospedador.

Genes indicadores

Al igual que existen vectores especializados para ciertas aplicaciones, también existen genes o porciones de genes especializados que resultan útiles en la ingeniería genética. Ya hemos visto la forma en la que algunos promotores y operadores pueden utilizarse en la construcción de vectores de expresión. También hemos descrito la utilidad de tener el sitio de clonación dentro de un gen cuya actividad sea fácil de evaluar. El sistema que hemos descrito con más detalle es aquél en el que se utilizaba el gen que codifica la β-galactosidasa, a saber, *lacZ* (*véase* Figura 15.1). La actividad de la enzima β-galactosidasa puede detectarse fácilmente en las placas indicadoras o con ensayos sencillos. Por lo tanto, *lacZ* puede utilizarse como *gen indicador*.

Los **genes indicadores** son genes incorporados en vectores, puesto que codifican proteínas que son fáciles de detectar. Pueden utilizarse para señalar la presencia o ausencia de un elemento genético completo, o para determinar su ubicación; además, también pueden fusionarse con otros genes o con el promotor de otros genes para estudiar la expresión de los mismos. Existen muchos otros genes indicadores además de *lacZ*. Por ejemplo, la enzima luciferasa, a la que ya hemos aludido en otra ocasión, hace que las células expresen el gen de forma luminiscente (*véase* Figura 8.22). De esta forma, las colonias que contienen este sistema indicador se detectan en placas de agar gracias precisamente a la luminiscencia que presentan en medio de un fondo de otras colonias. La producción y la detección de luciferasa implican por lo general más de un gen, así como otros factores adicionales. Recientemente, un gen que codifica una proteína fluorescente, denominada *proteína fluorescente verde* (GFP, *Green Fluorescent Protein*), se ha aislado de la medusa *Aequorea victoria* y se ha clonado. La GFP no necesita factores adicionales, y se ha utilizado como indicador o etiqueta en una gran variedad de organismos (*véase* Figura 31.5).

✓ 31.4 Revisión de conceptos

Muchos genes clonados no se expresan de forma eficaz en el nuevo hospedador. Se han desarrollado vectores de expresión que contienen una gran variedad de genes o porciones de genes que aumentan el nivel de transcripción del gen clonado y hacen que la transcripción esté sujeta a una regulación específica. El vector de expresión también puede incluir señales para mejorar la eficacia de la traducción. Se han desarrollado vectores de expresión y otros vectores especializados, tanto para hospedadores procarióticos como para hospedadores eucarióticos.

- ✓ Describa algunos de los elementos de los vectores de expresión que mejoran la transcripción del gen clonado
- ✓ Los genes indicadores se incluyen con frecuencia como parte de los vectores de clonación. ¿Qué es un gen indicador?

31.5 Expresión de genes de mamíferos en bacterias

En el pasado, uno de los grandes retos a los que se enfrentaba la ingeniería genética que deseaba clonar y expresar un gen de mamífero completo era simplemente encontrar el clon adecuado. En este capítulo hemos descrito algunos de los métodos que pueden utilizarse para realizar esto (*véase* Sección 31.3). Sin embargo, la secuenciación y la anotación del genoma humano, como parte del proyecto de genoma humano, están bastante avanzadas. Seguirá habiendo problemas para determinar las funciones de los genes, pero ahora es posible utilizar la información sobre la secuencia para buscar clones de interés específico en las bibliotecas de genes o genotecas. También se están secuenciando otros genomas de mamíferos, tales como los del ratón. Aun cuando el genoma del organismo de interés no se haya secuenciado,

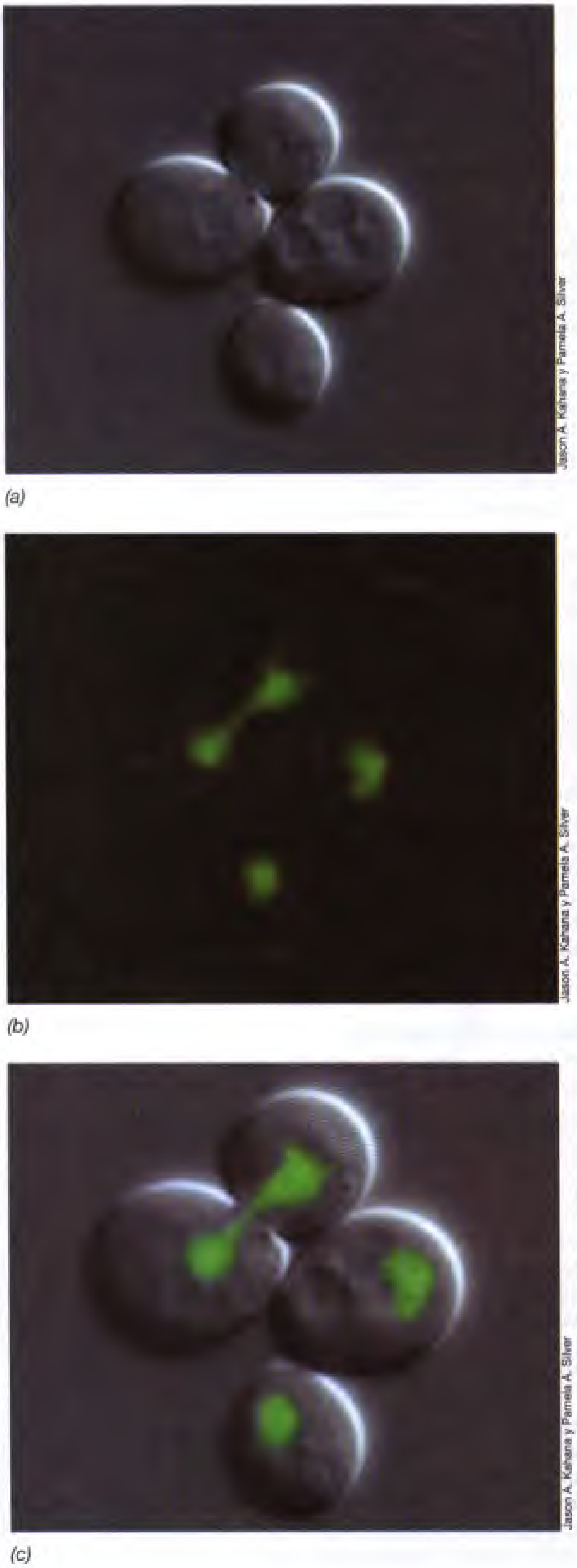

(a)
Jason A. Kahana y Pamela A. Silver
(b)
Jason A. Kahana y Pamela A. Silver
(c)
Jason A. Kahana y Pamela A. Silver

Figura 31.5 La proteína fluorescente verde (GFP) puede utilizarse como indicador para la localización de proteínas *in vivo*. El gen que codifica Pho2, una proteína ligada al DNA de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se unió con el gen que codifica la GFP. El gen recombinante se transformó en células de levadura, que pudieron expresar a continuación la proteína de función fluorescente que estaba localizada en el núcleo. (a) Las células que expresan Pho2-GFP se reservaron mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial y (b), mediante microscopía de epifluorescencia (*véanse* Secciones 4.1 y 4.2). (c) Este panel es una superposición de las imágenes de (a) y (b).

es posible utilizar la información sobre la secuencia en genes relacionados para diseñar iniciadores de DNA y clonar el gen utilizando la PCR (*véase* Sección 10.17).

Sin embargo, sigue existiendo obstáculos incluso cuando se tiene un gen de mamífero clonado en un vector de expresión. Uno de los más importantes es la presencia de intrones (*véase* Sección 7.12). Un intrón contenido en un gen de mamífero que codifica una proteína no puede ser eliminado por el hospedador procariótico. Como la mayor parte de los genes de mamíferos contiene intrones, no funcionarán en un hospedador procariótico. Muchos genes de mamíferos tienen 50 o más intrones, y éstos pueden contener decenas o incluso cientos de miles de pares, por lo que se necesitan métodos potentes y eficaces para eliminarlos. En este punto describiremos dos métodos de este tipo. En ambos casos los intrones no se eliminan de los genes clonados pero, en su lugar, se eliminan de la clonación.

Obtención del gen a partir del RNA mensajero

Uno de los métodos para aislar un gen funcional consiste en obtenerlo a partir de su mRNA. Una de las principales ventajas de utilizar el mRNA es que se ha eliminado la información no codificadora (intrones) presente en el DNA (*véase* Sección 7.12). El mRNA aislado se utiliza para crear DNA complementario (cDNA) mediante el proceso conocido como transcripción inversa (*véanse* Secciones 9.12 y 16.14). Es posible que un tejido que exprese el gen contenga grandes cantidades del mRNA deseado, aunque lo más normal es que estas células también produzcan muchos otros mRNAs. En una situación ideal, en la que un solo mRNA domine un tipo de tejido, la extracción del mRNA de dicho tejido proporciona un punto de inicio muy útil para la clonación del gen.

En una célula de mamífero típica, aproximadamente el 80% o el 85% del RNA es ribosómico, entre el 10 y el 15% está formado por RNA de transferencia y otros RNA de bajo peso molecular, mientras que del 1% al 1,5% es RNA mensajero. Aunque poco abundante, el mRNA mensajero de un eucariota se identifica por la presencia de las colas de poli-A que se encuentran en el extremo 3′ (*véase* Sección 7.12). Al pasar un extracto de RNA rico en poli-A por una columna cromatográfica que contenga fragmentos poli-T (unidos en soporte de celulosa), la mayor parte del mRNA de la célula puede separarse del otro RNA celular mediante apareamiento específico de las bases A y T. La posterior elución del RNA de la columna proporciona así una preparación altamente enriquecida en mRNA.

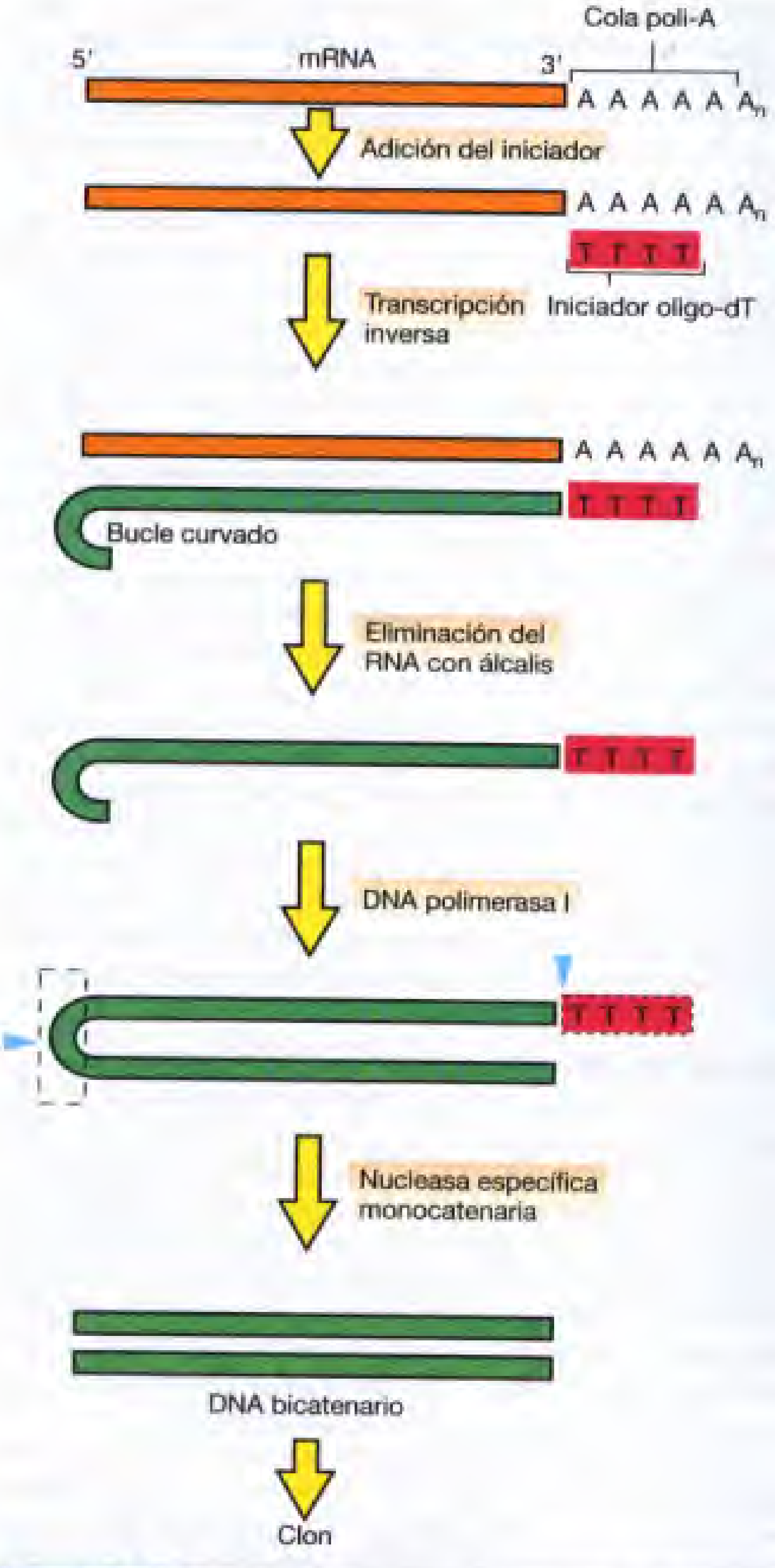


Figura 31.6 Pasos de la síntesis del DNA complementario (cDNA) a partir de un mRNA aislado mediante el uso de la enzima retrovírica transcriptasa inversa.

Una vez se ha aislado el RNA mensajero, es necesario convertir la información en DNA. Esta labor se realiza mediante el uso de la enzima *transcriptasa inversa* (*véanse* Secciones 9.12 y 16.14). Esta curiosa enzima, que constituye un componente esencial en la replicación de retrovirus, copia la información del RNA en el DNA (*véase* Figura 31.6). Como hemos señalado, esta enzima requiere un iniciador para empezar a funcionar (en el caso de los retrovirus el iniciador es un tRNA). En el procedimiento que nos ocupa, se utiliza un iniciador oligo-dT que es complementario con la cola poli-A del mRNA aislado. El iniciador oligo-dT se hibrida con el mRNA, a continuación de lo cual se deja actuar a la transcriptasa inversa (*véase* Figura 31.6). Como hemos visto, la copia de DNA recién sintetizado tiene un bucle curvado en su extremo que se forma porque una vez que la enzima completa la copia del mRNA, comienza a copiar el DNA recién sintetizado. Este bucle curvado, que probablemente es un artefacto de la reacción que tiene lugar en el tubo de ensayo, proporciona un iniciador muy útil para conseguir la síntesis de la segunda cadena de DNA. El DNA bicatenario resultante, con el bucle curvado intacto, es cortado a continuación por una nucleasa específica monocatenaria para producir el DNA bicatenario deseado, en el que una de las cadenas es complementaria con el mRNA. Este DNA bicatenario (el gen de interés) puede insertarse a continuación en un plásmido o en otro vector para proceder a su clonación. La detección de planes específicos utiliza los procedimientos descritos en la Sección 31.3. Como ya hemos mencionado en la Sección 10.17, también es posible utilizar la RT-PCR (transcriptasa inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa) para sintetizar grandes cantidades de cDNA sin tener que clonarlo.

El cDNA debe codificar la proteína de interés y, por lo tanto, puede ser considerado su «gen». A diferencia del gen «natural» del cromosoma de mamífero, éste no contiene ningún intrón. Aunque existe un codón de iniciación, no hay promotores, puesto que no se transcriben y, por lo tanto, su secuencia no estará en el mRNA (*véase* Sección 7.8). Los requisitos para conseguir altos niveles de expresión con genes construidos de este modo son simplemente los que se mencionaron en la sección dedicada a los vectores de expresión (*véase* Sección 31.4).

También es posible crear *bibliotecas (genotecas) de cDNA* a partir de tejidos distintos cuando se buscan genes cuya expresión es específica para dichos tejidos. Esto puede ser extremadamente útil, porque el gen verdadero (DNA cromosómico) se encuentra prácticamente en todas las células, mientras que el mRNA se encuentra únicamente en las células que producen activamente la proteína. Por ejemplo, el agente que codifica la hormona insulina se encuentra por todo el cuerpo, pero el mRNA de la insulina se encuentra únicamente en algunas células del páncreas. Por lo tanto, una genoteca hecha a partir de las células del páncreas está enriquecida en cDNA correspondiente al gen de la insulina.

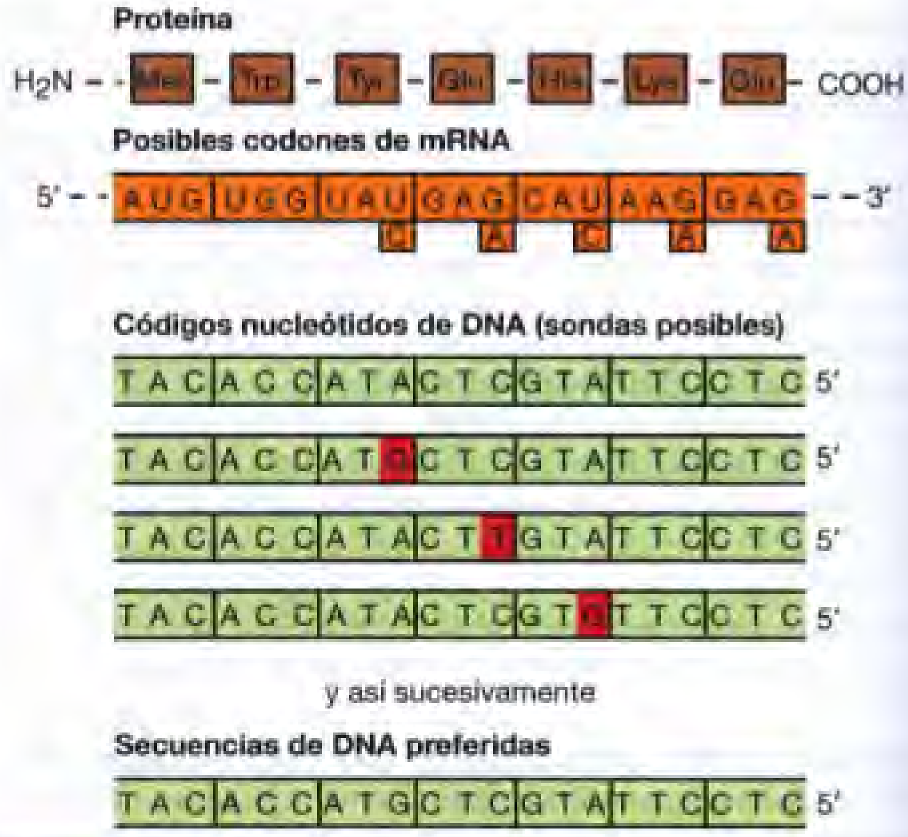

Proteína
H2N
Met
Trp
Tyr
Glu
His
Lys
Glu
COOH
Posibles codones de mRNA
5'
AUG UGG UAU GAG CAU AAG GAG
3'
C
A
C
A
A
Códigos nucleótidos de DNA (sondas posibles)
TAC ACC ATA CTC GTA TTC CTC 5'
TAC ACC ATG CTC GTA TTC CTC 5'
TAC ACC ATA CTT GTA TTC CTC 5'
TAC ACC ATA CTC GTG TTC CTC 5'
y así sucesivamente
Secuencias de DNA preferidas
TAC ACC ATG CTC GTA TTC CTC 5'

Figura 31.7 Traducción inversa: deducción de la mejor secuencia de una sonda de oligonucleótidos a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína. Debido a la degeneración, son posibles muchas ondas. Si se conoce el uso de codones que hace el mismo organismo, puede seleccionarse una secuencia preferida. No es imprescindible conseguir una precisión completa, puesto que se permite una pequeña proporción de apareamientos erróneos.

Obtención del gen a través de la proteína

Al principio de esta sección hemos mencionado que el conocimiento de la secuencia de un gen puede facilitar la detección del mismo en una genoteca o en su clonación utilizando la PCR. Esto es posible por el hecho de que la información de la secuencia puede utilizarse para crear una molécula de DNA sintético que se utiliza como sonda (*véase* Sección 10.13). Este método puede utilizarse también para diseñar una sonda que sea capaz de encontrar el mRNA o el cDNA creado a partir del mismo. Sin embargo, esta información puede utilizarse de modo distinto para *construir* realmente un gen.

En el Capítulo 15 describimos la forma en la que el análisis de las secuencias de DNA y, en especial, la búsqueda de marcos abiertos de lectura (ORF, *Open Reading Frames*), pueden utilizarse para detectar genes posibles (*véase* Sección 15.2). Como vimos, sin embargo, el hecho de que exista un ORF no significa que éste sea funcional, es decir, que realmente codifique una proteína. Un método para comprobar que un ORF es un gen funcional consiste en buscar una proteína cuya secuencia de aminoácidos pueda predecirse mediante la secuencia de nucleótidos del ORF.

Todas las células procesan la información genética de acuerdo con el dogma central (DNA → RNA → proteína; *véase* Sección 7.1). Sin embargo, un investigador puede invertir este flujo de información. Dicho de otro modo, un experto en ingeniería genética puede utilizar la secuencia de aminoácidos de una proteína para diseñar y sintetizar una secuencia de nucleótidos que puedan codificarla. Este proceso recibe el nombre de *traducción inversa*. El procedimiento de traducción inversa se muestra en la Figura 31.7. A partir del código genético, se deduce la secuencia de nucleótidos de una sección del DNA, a continuación de lo cual se sintetiza este trozo de DNA. Por desgracia, la degeneración del código genético (*véase* Sección 7.13) complica en cierto modo el problema. La mayor parte de los aminoácidos están codificados por más de un codón, y el uso de los codones varía de un organismo a otro. La mejor sección del DNA para ser sintetizada es la que corresponde a una parte de la proteína rica en aminoácidos especificados por un solo codón (metionina, AUG; triptófano, UGG) o por dos codones (por ejemplo, fenilanina, UUU, UUC; tirosina, UAU, UAC; histidina, CAU, CAC), puesto que esto aumenta las posibilidades de que el DNA sintetizado sea complementario o prácticamente complementario con el mRNA de interés. Si no se conoce la secuencia completa de aminoácidos de la proteína, la secuencia que suele utilizarse es la que se encuentra situada en el extremo de la proteína, puesto que es en este extremo amino-terminal donde comienza la secuenciación de la misma.

Para crear una sonda que permita identificar el gen verdadero, su mRNA o el cDNA creado a partir de este último, es importante que el DNA sintético sea lo más complementario posible. No obstante, no es necesario disponer de la secuencia completa de la proteína codificada por el gen. Frente a esto, esta información sí se necesita cuando se desea construir un gen *sintético* completo. Al construir un gen también es importante no utilizar simplemente cualquiera de los codones degenerados de un aminoácido concreto, sino elegir los codones preferidos por el organismo que *expresará* el gen clonado. ¿Por qué íbamos a elegir sintetizar un gen completo?

Muchas proteínas de mamíferos (incluidas las hormonas péptidas) son los productos del procesamiento postraduccional (*véase* recuadro relativo al procesamiento de las proteínas del Capítulo 8) y, por lo tanto, pueden ser bastante pequeñas. Si uno está interesado en producir únicamente una hormona péptida, puede ser más eficaz construir un gen que codifique sólo la hormona final y no la proteína completa de la que procede. También puede ocurrir, incluso en el caso de una proteína más grande, que el cambio en el uso de cordones para lograr una traducción eficaz en el hospedador especificado se encuentre económicamente justificada. Además, la síntesis química no sólo permite la adquisición de genes que no pueden obtenerse de otro modo, sino que además permite la síntesis de *genes modificados* que pueden crear nuevas proteínas de utilidad. Las técnicas existentes para la síntesis de moléculas de DNA se encuentran bien desarrolladas en la actualidad y permiten sintetizar genes que codifiquen proteínas de 100 a 200 residuos de aminoácidos de longitud (de 300 a 600 nucleótidos). Para la producción de la hormona humana insulina en bacterias se ha utilizado el método sintético, tal como veremos en la Sección 31.6.

Con el uso de todas estas técnicas, se ha expresado un gran número de proteínas humanas distintas, y a un alto rendimiento, bajo el control de sistemas reguladores bacterianos, entre los que figuran la hormona humana del crecimiento, la insulina, los antígenos víricos, el interferón y la somatostatina (*véase* Sección 31.6).

Plegado y estabilidad de las proteínas

Por desgracia, en ocasiones la capacidad para sintetizar una proteína en un nuevo hospedador no es suficiente. Algunas proteínas son propensas a la degradación por parte de proteasas intracelulares, por lo que pueden destruirse antes de ser aisladas. Ciertas proteínas eucarióticas son tóxicas para el hospedador procariótico, por lo que el hospedador del vector de clonación puede quedar aniquilado antes de poder sintetizar una cantidad suficiente del producto. Así, puede ser necesario realizar una mayor ingeniería del hospedador o del vector para eliminar estos problemas.

En ocasiones, cuando las proteínas foráneas se producen de forma masiva, forman cuerpos de inclusión dentro del hospedador. Aunque los cuerpos de inclusión son relativamente fáciles de purificar gracias a su tamaño, la proteína que se encuentra en estos cuerpos puede ser muy difícil de disolver. Parece que en muchos casos estos cuerpos se forman porque la proteína no está correctamente plegada. Una solución potencial a este problema consiste en utilizar un hospedador que produzca un exceso de chaperones moleculares que ayuden a conseguir este plegado (*véase* Sección 7.16). Se da la circunstancia de que este problema, y algunos otros, pueden resolverse en ocasiones si la proteína del gen clonado se fabrica como producto de fusión con una proteína codificada por el vector. Esto no sólo estabiliza la proteína, sino que simplifica la purificación si la porción codificada por el vector es una proteína para la que se conocen técnicas de purificación rápidas, sencillas y baratas. En la actualidad existen algunos vectores de fusión especiales. La «proteína clonada» se separa de la proteína de fusión después de realizar la purificación con proteasas especiales. La Figura 31.8 muestra un ejemplo de un *vector de fusión* que es también un vector de expresión.

En algunos casos la proteína deseada también puede separarse de la proteína de fusión mediante métodos químicos. Los sistemas de fusión también pueden utilizarse para propósitos que no sean la consecución de un aumento de la estabilidad de la proteína. Una de las ventajas de crear una proteína de fusión consiste en que la porción bacteriana puede contener la codificación de la secuencia bacteriana para el *péptido señal* que permite transportar la proteína a través de la membrana citoplasmática (*véase* Sección 7.16), lo que a su vez fomenta el desarrollo de un sistema bacteriano que no sólo sintetiza la proteína de mamífero, sino que también la secreta.

Incluso con el vector mejor diseñado, algunos genes se expresan pobremente en una célula concreta. En algunos casos estos problemas pueden rectificarse utilizando un hospedador mutante. Por ejemplo, algunos «mRNAs foráneos»

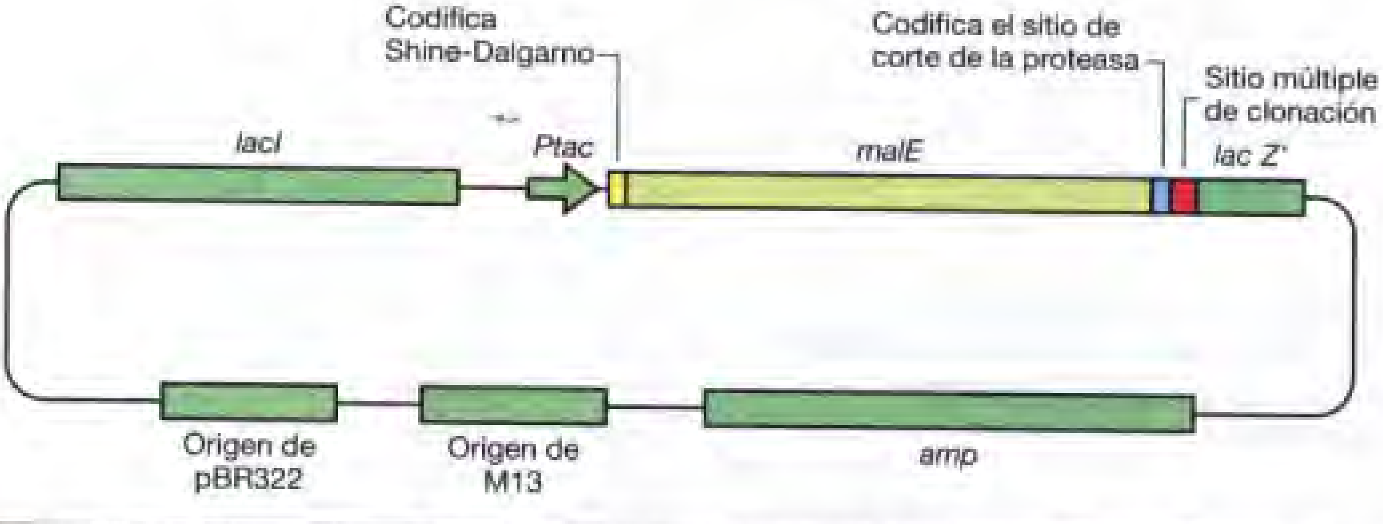


Figura 31.8 Vector de expresión para fusiones. Este vector fue desarrollado por New England Biolabs Company. El gen que se va a clonar se inserta en el sitio múltiple de clonación (*véase* Figura 15.1), de manera que quede en el mismo marco que el gen *malE*, que codifica la proteína de unión de la maltosa. Esta inserción desactiva el gen *lacZ'* (*véase* Figura 15.1). El gen fusionado se encuentra bajo el control del promotor híbrido *tac* (*Ptac*). El plásmido también contiene el gen *lacI*, que codifica el represor *lac*. Por lo tanto, es preciso añadir un inductor a las células con el fin de poner en marcha el promotor *tac*. La proteína de fusión se purifica fácilmente mediante métodos que implican la afinidad de la proteína por la maltosa. Una vez codificada, las dos porciones de la proteína de fusión pueden separarse mediante una proteasa muy específica (factor Xa). El plásmido contiene un gen que confiere resistencia a la ampicilina en su hospedador. Además del origen de replicación del plásmido, existe un origen del bacteriófago M13; por lo tanto, es un *fásmido* y puede propagarse como plásmido o como fago.

se degradan muy rápidamente en *Escherichia coli* del tipo silvestre, pero no en cepas mutantes concretas. Así, con el uso de tales sistemas de expresión, se pueden producir grandes niveles de proteínas de mamífero en *Escherichia coli*. En muchos casos, la proteína deseada supera las 200 000 moléculas por célula y puede representar hasta el 40% de las moléculas de proteínas de una célula.

✓ *31.5 Revisión de conceptos*

Es posible conseguir niveles muy altos de expresión de genes de mamíferos en *Bacteria*. Sin embargo, estos genes suelen ser invariablemente distintos del gen nativo, puesto que es fundamental que no contenga intrones. Esto puede realizarse utilizando la transcriptasa inversa para sintetizar el DNA complementario (cDNA) a partir del RNA mensajero (mRNA). Además, también puede conseguirse sintetizando gen sintético completo, siempre y cuando se conozca la secuencia de aminoácidos de la proteína que se desea codificar.

- ✓ ¿Por qué el mRNA no contiene intrones?
- ✓ ¿Qué utilidad puede tener la proteína de interés que se crea como producto de fusión?

II APLICACIONES PRÁCTICAS DE LA INGENIERÍA GENÉTICA

En esta unidad mencionaremos tan sólo unas pocas de las muchas aplicaciones que tiene la ingeniería genética dentro del campo de la biotecnología. De hecho, algunas áreas quedarán sin tratar en absoluto. Hablaremos, entre otros, del uso de la ingeniería genética para mejorar la fermentación microbiana, sobre todo en la producción de antibióticos (*véase* Sección 30.6). No hablaremos del uso de organismos genéticamente modificados en la biotecnología medioambiental. Cabe reseñar, además, que la diversidad metabólica de los procariotas es enorme (*véase* Capítulo 17), y muchas de estas vías metabólicas pueden recombinarse para crear métodos nuevos y útiles. Por lo tanto, en las tres secciones que se incluyen a continuación no sólo presentaremos una visión global de las muchas posibilidades que existen, sino también de las aplicaciones reales que se encuentran disponibles para los campos de la agricultura y la medicina.

31.6 Obtención de productos de mamíferos y de vacunas mediante organismos genéticamente modificados

Una de las primeras aplicaciones prácticas de la ingeniería genética fue la utilización de bacterias que crecían fácilmente para producir proteínas cuyos genes procedían de organismos que eran más difíciles o caros de cultivar. Aunque las DNA polimerasas especiales usadas en la reacción en cadena de la polimerasa se instalaron originalmente de bacterias termófilas (*véase* Sección 10.17), ahora se producen en *Escherichia coli* a partir de genes clonados. La mayor parte de las enzimas de restricción también se producen en *Escherichia coli* a partir de genes clonados. Cabe reseñar que *Escherichia coli* no es más fácil de cultivar que algunas de las bacterias que normalmente sintetizan una enzima de restricción concreta. Sin embargo, la clonación permite la manipulación de los niveles de expresión (*véase* Sección 31.4) y la utilización del mismo hospedador resulta más eficaz, ya que una empresa puede emplear condiciones de cultivo similares o idénticas para fabricar productos distintos. De manera similar, muchas proteínas usadas en el sector industrial se producen hoy en día a partir de genes clonados y, en algunos casos, la propia proteína ha sido alterada utilizando mutagénesis dirigida (*véase* Sección 10.18) para modificar el gen clonado.

Muchas proteínas y péptidos de mamíferos poseen un elevado valor farmacéutico. Con todo, estas proteínas suelen estar presentes en cantidades muy pequeñas en los tejidos normales, por lo que su purificación resulta sumamente costosa. Además, aun cuando la proteína pueda producirse en cultivos de células (*véase* Sección 9.3), ésta es una técnica mucho más cara de la creación de cultivos microbianos. Por lo tanto, otro de los esfuerzos tempranos de la industria de la biotecnología consistió en el uso de ingeniería genética para producir estas proteínas en microorganismos.

En muchas de las primeras aplicaciones, tales como la producción de insulina, se sabía que el producto tenía un gran valor comercial gracias a su valor terapéutico demostrado para tratar algún tipo de enfermedad conocida (en este caso, la diabetes). Sin embargo, dicho éxito no está siempre garantizado, ni siquiera cuando la proteína puede producirse y purificarse sin problemas. A menudo esto se debe a que el proceso de evolución de la enfermedad es muy complejo y no se entiende en su totalidad, o a que el producto tiene efectos secundarios inesperados. A pesar de todo, a finales de los años noventa las empresas de biotecnología tenían cientos de productos que estaban sometidos a pruebas clínicas. Así es como se han producido algunas proteínas terapéuticas, entre las que figuran las hormonas, los interferones, los factores de crecimiento y algunas vacunas. Algunos ejemplos de estos y otros productos se encuentran incluidos en la Tabla 31.1.

Producción de insulina

Uno de los primeros y más espectaculares éxitos comerciales fue la producción de la hormona **insulina**. Muchas hormonas son péptidos o pequeñas proteínas. Estas moléculas son extremadamente importantes para controlar el metabolismo de los mamíferos y tienen usos terapéuticos muy importantes. La insulina es una proteína que se produce en el páncreas y que resulta imprescindible para regular el metabolismo de los carbohidratos en el cuerpo humano. La diabetes, una enfermedad caracterizada por una insuficiencia de insulina, afecta a millones de personas. El tratamiento estándar para este trastorno consiste en administrar periódicamente inyecciones o dosis orales de insulina. Además, como las insulinas de la mayor parte de los mamíferos tienen una estructura similar, es posible tratar la diabetes humana utilizando insulina comercial procedente del páncreas de terneros o de cerdos. Sin embargo, como la insulina no humana no resulta tan eficaz como la *insulina humana* y, además, el proceso de aislamiento es caro y complejo, se ha llevado a cabo la clonación de un «gen» de la insulina humana en bacterias.

TABLA 31.1 Algunos productos terapéuticos fabricados mediante ingeniería genética

Producto	Función
Proteínas de la sangre	
Eritropoyetina	Trata ciertos tipos de anemia
Factores VII, VIII y IX	Favorecen la coagulación
Activador tisular del plasminógeno	Disuelve coágulos
Uroquinasa	Coagulación de la sangre
Hormonas humanas	
Factor del crecimiento epidérmico	Cicatrización de las heridas
Hormona estimulante del folículo	Tratamiento de alteraciones de la reproducción
Insulina	Tratamiento de la diabetes
Factor de crecimiento del nervio	Posible tratamiento de alteraciones neurológicas
Relaxina	Facilita el parto
Somatotropina (hormona del crecimiento)	Tratamiento de algunos tipos de trastornos del crecimiento y la baja estatura
Moduladores inmunitarios	
α-interferón	Agente antivírico y antitumoral
β-interferón	Tratamiento de la esclerosis múltiple
Factor estimulante de la colonia	Tratamiento de infecciones y del cáncer
Lisozima	Antiinflamatorio
Factor de la necrosis tumoral	Agente antitumoral, tratamiento potencial de la artritis
Enzimas de reemplazo	
β-glucocerebrosidasa	Tratamiento de la enfermedad de Gaucher, un trastorno neurológico hereditario
Vacunas	
Hepatitis B	Prevención de la hepatitis sérica
Enfermedad de Lyme	Prevención de la infección
Sarampión	Prevención del sarampión
Rabia	Prevención de la rabia

La producción de hormonas tales como la insulina en microorganismos genéticamente modificados no consiste simplemente en clonar un gen (o un cDNA) en un vector de expresión (*véase* Sección 31.5). Esto se debe a que muchas de estas hormonas son tan sólo pequeños fragmentos de los polipéptidos codificados por el gen. La insulina, en su forma activa, consta de dos polipéptidos (A y B) conectados por puentes disulfuro (*véase* Figura 31.9*a*). Estos dos polipéptidos están codificados por partes separadas del mismo gen de la insulina. El gen de la insulina codifica la *preproinsulina*, un polipéptido más largo que contiene una secuencia señal (implicada en la secreción de la proteína) (*véase* Sección 6.9), los polipéptidos A y B de la molécula de insulina activa, y un polipéptido de unión que está ausente en la insulina madura. La *proinsulina* se forma a partir de la preproinsulina, y la conversión de proinsulina en insulina implica la rotura enzimática del polipéptido de unión entre las cadenas A y B (*véase* recuadro relativo al procesamiento de las proteínas del Capítulo 8).

Hasta la fecha, se han utilizado dos métodos para la producción de insulina humana en bacterias: (1) producción de proinsulina y conversión en insulina mediante métodos químicos, y (2) producción de las cadenas A y B en dos cultivos bacterianos separados, así como unión de las dos cadenas mediante procedimientos químicos para producir insulina. Como la proteína insulina es bastante pequeña, en cualquiera de los dos casos resultaba más útil sintetizar químicamente la secuencia de DNA adecuada (*véase* Sección 10.13) e intentar aislar el gen de la insulina a partir de tejido humano. Hay 63 bases que codifican la cadena A y 90 bases que codifican la cadena B. En la proinsulina existen otras 105 bases adicionales que codifican el péptido que conecta las cadenas A y B (*véase* Figura 31.9*b*). Cuando se sintetizaron los polinucleótidos, en los extremos se situaron sitios de corte adecuados para las enzimas de restricción, de manera que el polinucleótido pudiera quedar ligado dentro del plásmido vector. Para obtener una expresión eficaz, los genes sintetizados se insertaron debajo de un promotor adecuado de *Escherichia coli*, pero de manera que el fragmento de insulina se sintetizara como parte de una *proteína de fusión* (*véase* Sección 31.5). Una de las ventajas más importantes de fabricar una proteína de fusión consiste en que el producto de fusión es mucho más estable en *Escherichia coli* que en la propia insulina. Por último, se colocó un triplete codificador de la metionina en el punto que unía el gen de la insulina con la parte superior del gen de fusión. Esto se debe a que el reactivo químico *bromuro de cianógeno* corta específicamente las cadenas polipeptídicas por los residuos de metionina, lo que permite la recuperación de la insulina una vez que la proteína de fusión se ha aislado de la bacteria. La insulina en sí misma no contiene metionina y, por lo tanto, no se ve afectada por el tratamiento con bromuro de cianógeno.

Cuando se utiliza la ruta de la proinsulina, la proinsulina, aislada de las bacterias mediante el tratamiento con bromuro de cianógeno, se convierte en insulina cuando se forma un enlace disulfuro y se produce la eliminación enzimática del péptido de unión. La proinsulina se pliega de forma natural, de manera que los residuos de cisteína quedan unos enfrente de otros (*véase* Figura 31.9*a*), con lo que el tratamiento químico provoca la formación de enlaces disulfuro transversales. Una vez realizado esto, el péptido de unión puede eliminarse mediante un tratamiento con las proteasas tripsina y carboxipeptidasa B, que no tienen efecto alguno en la insulina en sí misma.

Cuando la insulina se produce mediante los péptidos separados A y B, cada una de las proteínas de fusión se aísla de un cultivo bacteriano independiente y las cadenas se separan mediante el corte con bromuro de cianógeno. Las cadenas cortadas se conectan a continuación mediante el uso de un tratamiento químico que da lugar a la formación del enlace disulfuro.

El producto final, a saber, la insulina humana biosintética, es idéntico en todos los aspectos a la insulina purificada del páncreas humano. La insulina humana producida por métodos microbianos es menos cara y tiene una eficacia idéntica a la de las insulinas porcina o bovina, que constituían la fuente principal de la insulina para diabéticos antes de la llegada de la biotecnología.

Vacunas recombinantes

Las vacunas son suspensiones de microorganismos patógenos, aniquilados o modificados, o de fracciones específicas

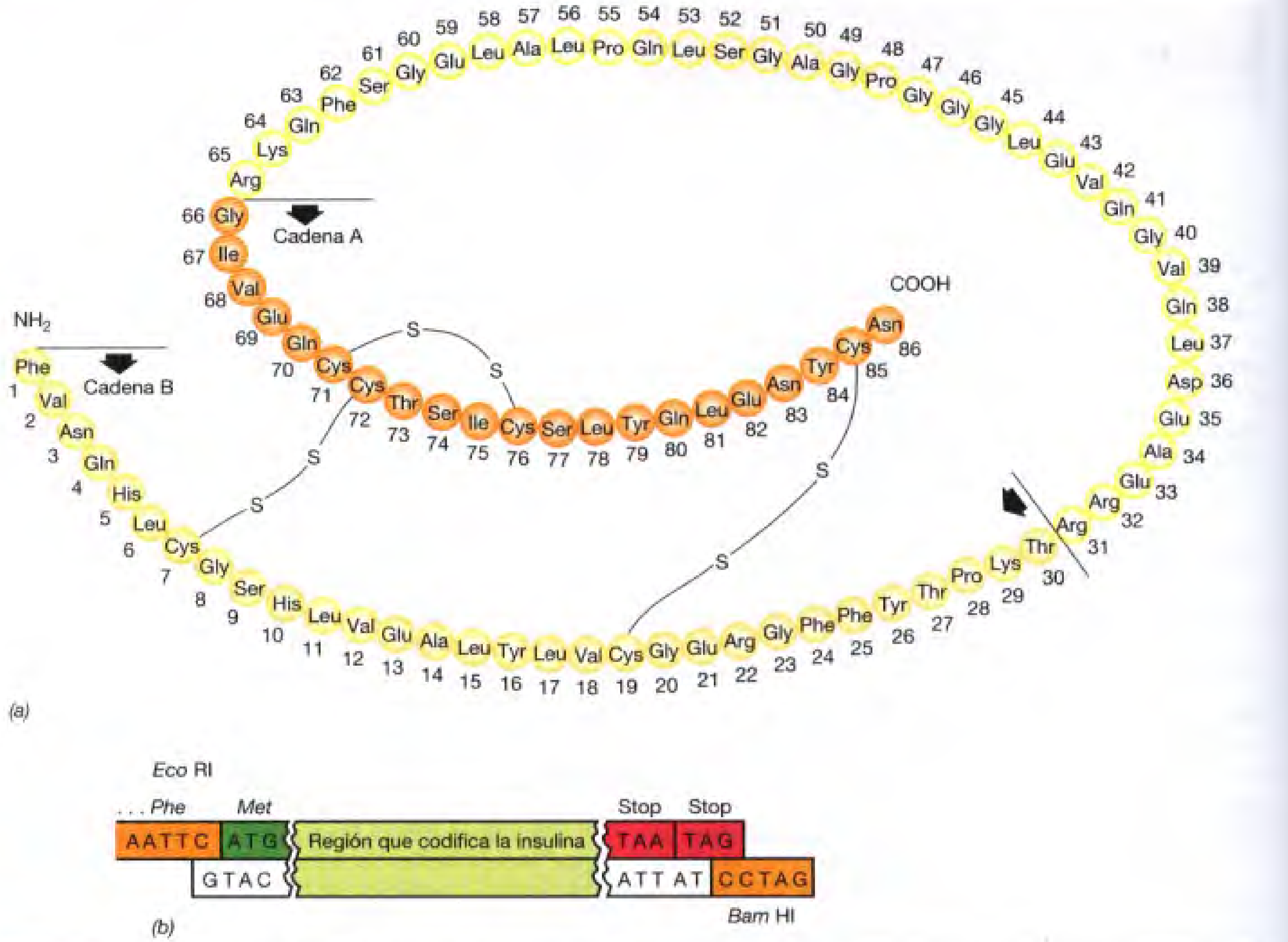

NH₂
Cadena B
1 Phe
2 Val
3 Asn
4 Gln
5 His
6 Leu
7 Cys
8 Gly
9 Ser
10 His
11 Leu
12 Val
13 Glu
14 Ala
15 Leu
16 Tyr
17 Leu
18 Val
19 Cys
20 Gly
21 Glu
22 Arg
23 Gly
24 Phe
25 Phe
26 Tyr
27 Thr
28 Pro
29 Lys
30 Thr
31 Arg
32 Arg
33 Glu
34 Ala
35 Glu
36 Asp
37 Leu
38 Gln
39 Val
40 Gly
41 Gln
42 Val
43 Glu
44 Leu
45 Gly
46 Gly
47 Gly
48 Pro
49 Gly
50 Ala
51 Gly
52 Ser
53 Leu
54 Gln
55 Pro
56 Leu
57 Ala
58 Leu
59 Glu
60 Gly
61 Ser
62 Phe
63 Gln
64 Lys
65 Arg
Cadena A
66 Gly
67 Ile
68 Val
69 Glu
70 Gln
71 Cys
72 Cys
73 Thr
74 Ser
75 Ile
76 Cys
77 Ser
78 Leu
79 Tyr
80 Gln
81 Leu
82 Glu
83 Asn
84 Tyr
85 Cys
86 Asn
COOH
S
S
S
S
S
S
(a)
Eco RI
. . . Phe
Met
Stop
Stop
AATTC
ATG
Región que codifica la insulina
TAA
TAG
GTAC
ATT AT
CCTAG
Bam HI
(b)

Figura 31.9 Ingeniería genética para la producción de insulina humana en bacterias. (a) Estructura de la proinsulina humana. El péptido que se muestra en amarillo, uniendo las cadenas A y B, debe eliminarse para fabricar insulina. (b) Síntesis química del gen de la insulina y enlaces adecuados para permitir la clonación y la expresión. Los fragmentos sintetizados se ligaron a través de los sitios de restricción *Eco*RI y *Bam*HI de un plásmido vector, de manera que las cadenas de insulina se formaran como una proteína de fusión (*véase* Sección 10.7) con una porción de un gen que se encuentra en el vector (obsérvese que el sitio *Eco*RI forma parte de esta región codificadora). Se insertó la secuencia que codifica la metionina para permitir la separación química de las cadenas A y B de la proteína de fusión expresada en las bacterias, puesto que el reactivo bromuro de cianógeno corta específicamente por los residuos de metionina y la insulina no contiene metionina. Se incorporaron dos codones de parada en el extremo derecho de la secuencia codificadora.

aisladas de estos microorganismos que, cuando se inyectan a un animal, producen inmunidad frente a una enfermedad concreta. Con frecuencia, la sustancia que pone en marcha la respuesta inmunitaria es una proteína de la superficie, como puede ser la proteína de la cubierta de un virus. La ingeniería genética podría aplicarse de muy distintas maneras para la producción de vacunas.

Las técnicas con DNA recombinante pueden facilitar muchísimo la modificación de un patógeno, precisamente porque las técnicas genéticas *in vitro* suelen ser más precisas y más potentes que las técnicas tradicionales *in vivo* (*véase* Capítulo 10). Por ejemplo, en algunos casos puede eliminarse simplemente los genes implicados en la virulencia, pero dejarse los que tienen productos que crean una respuesta inmunitaria, lo que da lugar a una *vacuna recombinante viva atenuada*. Por supuesto, con el uso de una tecnología recombinante es posible añadir genes a un virus que conferirá una inmunidad específica a una enfermedad vírica. En esta última categoría se encuentra un virus recombinante vivo que ofrece protección en las aves, tanto frente a la peste aviar (una enfermedad que reduce el aumento de peso y la producción de huevos), como frente a la enfermedad de Newcastle (una enfermedad vírica que resulta letal en la mayor parte de los casos). El virus de la peste aviar, un típico poxvirus (*véase* Sección 16.12), se modificó inicialmente eliminando los genes que causaban la enfermedad (pero no los que creaban la imunidad). Luego, se añadieron genes que provocaban inmunidad al virus de la enfermedad de Newcastle. Esto dio lugar a una *vacuna polivalente*, en este caso un solo virus que puede conferir inmunidad a dos enfermedades importantes distintas.

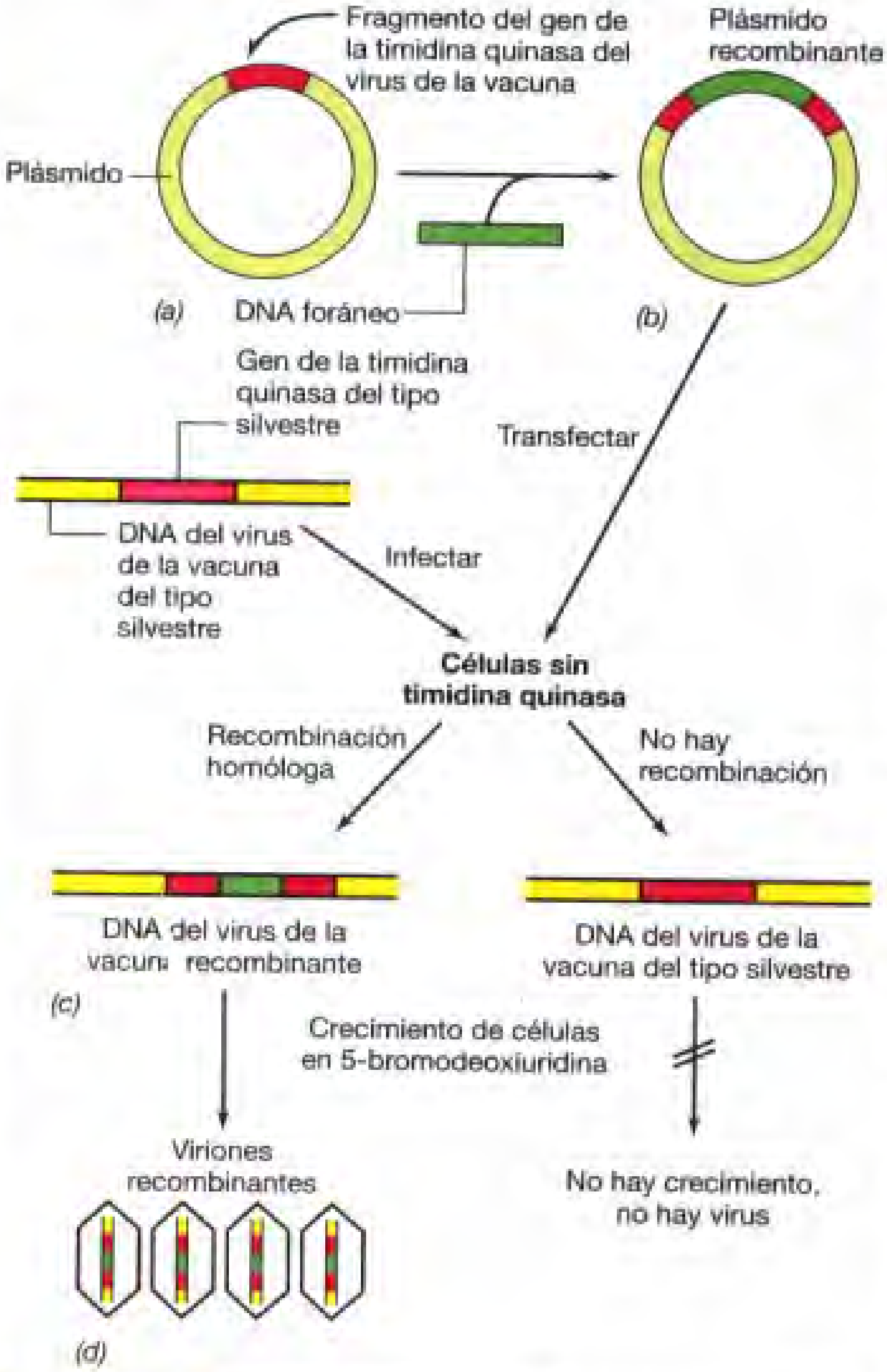

Fragmento del gen de la timidina quinasa del virus de la vacuna
Plásmido recombinante
Plásmido
(a)
DNA foráneo
(b)
Gen de la timidina quinasa del tipo silvestre
Transfectar
DNA del virus de la vacuna del tipo silvestre
Infectar
Células sin timidina quinasa
Recombinación homóloga
No hay recombinación
DNA del virus de la vacuna recombinante
DNA del virus de la vacuna del tipo silvestre
(c)
Crecimiento de células en 5-bromodeoxiuridina
Viriones recombinantes
No hay crecimiento, no hay virus
(d)

Figura 31.10 Producción del virus de la vacuna recombinante. (a) El DNA foráneo se clona en un plásmido que contiene una pequeña porción del gen de la timidina quinasa del virus de la vacuna. (b) Se forma el plásmido recombinante. (c) El plásmido recombinante se utiliza a continuación para la transfección a células hospedadoras que ya están infectadas con vacunas del tipo silvestre. Si se produce la recombinación, el DNA de la vacuna recombinante puede producirse. (d) Acto seguido, las células se colocan en presencia de 5-bromodeoxiuridina, un compuesto que es tóxico para las células que tienen una timidina quinasa activa. Sólo los viriones recombinantes se desarrollan en estas condiciones. Si los viriones de la vacuna recombinante contienen genes de otras proteínas de la cubierta del virus, éstos pueden expresarse.

Un vector utilizado para preparar vacunas recombinantes vivas es el *virus de la vacuna* (*véase* Sección 16.12). La clonación en el virus de la vacuna se realiza utilizando un plásmido de *Escherichia coli* que contiene un fragmento del gen de la timidina quinasa del virus de la vacuna (*véase* Figura 31.10*a*). A continuación se inserta un DNA foráneo apropiado en este plásmido, y el plásmido recombinante se transforma en una célula hospedadora cuya propia timidina quinasa está inactiva, pero que se ha infectado previamente con un virus de la vacuna del tipo silvestre (*véase* Figura 31.10*b*). Si se produce una recombinación homóloga entre el DNA del plásmido y el DNA genómico de la vacuna (*véase* Figura 31.10*c*), pueden obtenerse viriones recombinantes que tengan un gen de la timidina quinasa *inactivado*. Una timidina quinasa *activa* produce la inhibición del crecimiento debido al compuesto 5-bromodeoxiuridina. Por lo tanto, los viriones recombinantes del virus de la vacuna pueden seleccionarse permitiendo la replicación vírica en presencia de su inhibidor (*véase* Figura 31.10*d*). Aunque estos virus recombinantes no expresan ya la timidina quinasa, pueden seguir infectando células humanas y, además, expresan los genes foráneos que se han clonado en ellos. De hecho, algunos virus de vacunas recombinantes pueden llevar genes de cuatro virus distintos.

El virus de la vacuna en sí mismo no suele ser patógeno para humanos (el virus de la vacuna se utilizó originalmente como vacuna frente al virus de la peste aviar); sin embargo, el virus de la vacuna no es completamente benigno (causa algunas complicaciones en ciertas personas) y, por lo tanto, es preciso realizar más investigaciones antes de poder utilizar estas vacunas en humanos. Esta investigación incluye el uso de otros vectores víricos.

Las vacunas no tienen que incluir todo el organismo patógeno. Las *vacunas de subunidad* contienen únicamente una subunidad específica de un organismo patógeno. En el caso de los virus, éste suele ser la proteína de la cubierta del virus. Las proteínas de la cubierta altamente inmunógenas se purifican y se utilizan a altas dosis para producir un alto y rápido nivel de inmunidad. La ingeniería genética ha demostrado ser un elemento muy valioso en el desarrollo de vacunas de subunidad, puesto que las técnicas de DNA recombinante pueden utilizarse para producir grandes cantidades de estas subunidades y no hay posibilidad de que los productos codificados contengan el organismo patógeno ni siquiera en cantidades ínfimas.

Vacunas de subunidad

Los pasos para realizar la clonación del gen de un virus son los que se han presentado en las secciones anteriores: fragmentación del DNA vírico mediante enzimas de restricción; clonación de los genes de la proteína de la cubierta del virus dentro de un vector adecuado; creación de promotores, marcos de lectura y sitios de unión de los ribosomas adecuados; y reinserción y expresión de los genes víricos en un microorganismo. En algunos casos sólo se expresan ciertos *dominios* de la proteína, en lugar de la proteína en su totalidad.

Por desgracia, cuando *Escherichia coli* se utiliza como el hospedador de clonación, las vacunas suelen ser muy poco inmunógenas y no consiguen proteger a los animales de infecciones posteriores del virus. El problema radica en el hecho de que muchas proteínas antigénicas de la cubierta del virus se modifican en el proceso postraduccional, por lo general mediante la adición de residuos de azúcares (glicosilación), cuando el virus se replica en su hospedador normal. Sin embargo, las proteínas recombinantes producidas por *Escherichia coli* o por otras *Bacteria* no están glicosiladas, y parece que la glicosilación es necesaria para que las proteínas sean inmunológicamente activas; por lo tanto, se utiliza un hospedador eucariótico.

La primera vacuna de subunidad recombinante aprobada para su uso en humanos se fabricó utilizando levaduras. El gen que codifica la proteína de la superficie del virus de la hepatitis B fue clonado y expresado en una levadura. A continuación, se produjo una proteína que formaba agregados muy similares a los que se encuentran en los pacientes infectados con el virus y estos agregados se purificaron y se utilizaron para vacunar a las personas frente al virus de la hepatitis B. En la actualidad se está utilizando la ingeniería genética para desarrollar vacunas de subunidad frente a una gran variedad de virus y organismos patógenos. Así, se están utilizando células de insectos y células de mamíferos cultivadas como hospedadores para preparar vacunas recombinantes. Para obtener un patrón correcto de glicosilación u otras modificaciones de la proteína, con frecuencia es importante utilizar un hospedador que se encuentre estrechamente relacionado con los seres humanos. De todos modos, también es posible producir vacunas en plantas (*véase* Sección 31.7).

Las vacunas genéticamente modificadas pueden convertirse en algo habitual porque (1) son más seguras que las vacunas normales atenuadas o aniquiladas, (2) son más reproducibles, porque su construcción genética puede controlarse minuciosamente, y (3) pueden administrarse a altas dosis sin riesgo de que se produzcan efectos secundarios.

Las vacunas que se producen utilizando la ingeniería genética pueden fabricarse por lo general de forma mucho más rápida que las que se producen mediante métodos más tradicionales. Las vacunas recombinantes fabricadas con genes clonados de la hemaglutinina del virus de la gripe (*véase* Sección 16.7) pueden fabricarse en sólo dos o tres meses, en lugar de en seis o nueve meses. Esto puede constituir una ventaja real si se produce una epidemia causada por una cepa nueva del virus de la gripe (*véase* Sección 26.8). Las vacunas recombinantes también suelen ser más baratas que las producidas por otros métodos y esto, a su vez, puede permitir nuevos usos de las mismas. Se han distribuido cebos portadores de una vacuna recombinante para la rabia por amplios espacios de tierra en Europa, y han provocado un descenso drástico de la frecuencia de la rabia entre los zorros salvajes. En otras épocas, este método de vacunación habría sido demasiado caro.

Vacunas de DNA

Aunque algunas vacunas han obtenido un éxito extremadamente grande en la lucha frente a una amplia variedad de enfermedades infecciosas, existen otras enfermedades importantes para las que resulta difícil desarrollar vacunas que garanticen el éxito. Tal es el caso de las enfermedades como la malaria (*véase* Sección 27.5) y el SIDA (*véase* Sección 26.14). Aunque las técnicas de ingeniería genética «estándar» pueden ofrecer algunas vacunas eficaces frente a estas enfermedades, se ha emprendido un nuevo y excitante camino para desarrollar *vacunas de DNA*, también conocidas como *vacunas genéticas*. Las **vacunas de DNA** utilizan el material genético del patógeno en cuestión para conseguir la inmunización. Este material genético puede encontrarse en forma de fragmentos definidos del genoma del patógeno, o de genes del patógeno clonado en un plásmido vector o un vector vírico. Incluso en los últimos casos, sin embargo, es el DNA (o el RNA) el que se utiliza como vacuna.

En algunos casos parece que si se administra un gen completo a un animal de forma que sea absorbido por las células, la proteína comenzará a producirse, y el animal desarrollará inmunidad. Algunas de estas vacunas de DNA están siendo sometidas a ensayos clínicos, mientras que otras se encuentran aún en fase de desarrollo. Las vacunas de DNA serían seguras y baratas; además, a diferencia de las vacunas víricas, también evitarían la supervisión por parte del sistema inmunitario del hospedador.

Otras proteínas y otros productos

La Tabla 31.1 incorpora algunas de las proteínas y productos de mamíferos que se están produciendo mediante las técnicas de DNA recombinante. Se encuentran, entre ellas algunas hormonas, así como la insulina y ciertas proteínas implicadas en la coagulación de la sangre y otros procesos hematológicos. Por ejemplo, el *activador tisular del plasminógeno* (TPA) es una proteína que se encuentra en la sangre y actúa en las fases finales del proceso de cicatrización. El TPA presenta una utilidad clínica especial para pacientes con afecciones cardiacas o para cualquier persona que sufra algún trastorno de la circulación debido a una coagulación excesiva. El TPA puede administrarse después de la implantación de un bypass cardiaco, después de un trasplante o de cualquier otra operación a corazón abierto para impedir el desarrollo de embolias pulmonares, que a menudo representan un riesgo de muerte importante. Las enfermedades cardiovasculares constituyen una de las principales causas de muerte en los países desarrollados, por lo que es de esperar que el TPA producido microbiológicamente tenga cada vez más demanda en el futuro.

A diferencia del TPA, los factores de coagulación sanguínea VII, VIII y IX son muy importantes para la *formación* de coágulos. Los hemofílicos presentan una deficiencia de uno o más factores de coagulación, y pueden tratarse fácilmente con un producto producido microbiológicamente. El factor de coagulación recombinante adquiere más importancia aún si se tiene en cuenta que, en el pasado, los pacientes hemofílicos eran tratados con extractos concentrados de factores de coagulación procedentes de mezclas de sangre humana, algunas de las cuales estaban contaminadas con el virus del SIDA, por lo que tenían más riesgo de contraer dicha enfermedad.

Algunas proteínas pueden actuar como agentes anticancerígenos o como moduladores inmunológicos. Los *interferones* son una serie de proteínas fabricadas por células animales en respuesta a una infección vírica (*véase* Sección 23.10) o a la activación inmunitaria, en el caso de un tipo de interferón.

Algunas proteínas de mamíferos fabricadas mediante la tecnología de DNA recombinante no pueden incluirse en las categorías que se han incluido en la Tabla 31.1. Por ejemplo, la DNasa I humana se está fabricando y utilizando para evitar la acumulación de moco que contiene el DNA de pacientes con fibrosis quística. Hoy en día se están produciendo también anticuerpos monoclonales en microorganismos mediante el uso de la ingeniería genética (ya hablamos de los anticuerpos monoclonales en la Sección 24.6).

Bien es verdad que no todas las proteínas que se producen utilizando las técnicas de DNA recombinante tienen usos terapéuticos. Muchas enzimas comerciales (*véase* Sección 30.9) se producen de esta forma también. Además, incluso las hormonas pueden tener otros usos. La *somatotropina bovina* que se produce utilizando estas técnicas se utiliza en los Estados Unidos para aumentar la producción de leche del ganado. De hecho, con frecuencia, las «ventajas» de la ingeniería genética pueden ser totalmente inesperadas. La *renina*, que se utiliza para hacer queso, es un producto animal. En Gran Bretaña se está comercializando, hasta el momento con gran aceptación, un «queso vegetariano» que contiene una proteína recombinante producida en un microorganismo. Los primeros productos fabricados mediante ingeniería genética fueron sobre todo proteínas de genes clonados, aunque aún queda mucho por hacer en este campo. Otras aplicaciones adicionales se derivan de la posibilidad de usar la mutagénesis dirigida sobre el gen clonado, ya que así pueden generarse productos con propiedades nuevas. Es preciso recordar también que moléculas como los antibióticos se sintetizan en las células por vías bioquímicas que utilizan diversas enzimas (proteínas). Estas enzimas pueden modificarse y, de este modo, pueden desarrollarse antibióticos nuevos.

✓ 31.6 Revisión de conceptos

La primera proteína humana que se comercializó utilizando bacterias sometidas a ingeniería genética fue la insulina humana, pero ahora se producen otras hormonas y otras proteínas humanas. Muchas proteínas presentes en el cuerpo humano, que antiguamente eran extremadamente caras de producir porque se encontraban en los tejidos humanos en muy baja proporción, pueden fabricarse ahora en grandes cantidades a partir del gen clonado en un sistema de expresión adecuado. Además de productos farmacéuticos, tales como los agentes anticancerígenos o los moduladores inmunológicos, hoy en día es posible fabricar incluso vacunas utilizando la ingeniería genética.

- ✓ ¿Por qué es tan importante en ocasiones utilizar un hospedador estrechamente relacionado con los seres humanos para producir proteínas que se apliquen a fines terapéuticos?
- ✓ Explique las razones por las que las vacunas recombinantes podrían ser más seguras que algunas vacunas producidas por los métodos tradicionales.

31.7 Ingeniería genética en plantas agrícolas

La mejora genética de las plantas ha sido siempre una tarea lenta y difícil, pero la tecnología del DNA recombinante promete cambios revolucionarios. Hoy en día es posible utilizar técnicas genéticas *in vitro* para modificar un DNA vegetal y, a continuación, transformar las células vegetales con DNA libre mediante electroporación o por el método del disparador de partículas (*véase* Sección 10.6 y Sección 31.2), o bien utilizando vectores procedentes de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, que puede transferir DNA directamente a ciertas plantas (*véase* Sección 19.21). Es posible utilizar técnicas de cultivo de tejidos vegetales para seleccionar clones de células vegetales que hayan sido genéticamente alteradas utilizando técnicas *in vitro* y, a continuación, mediante tratamientos adecuados, inducir estos cultivos celulares a que produzcan plantas completas que puedan propagarse de forma vegetativa o por semillas.

Las plantas que resultan de estas manipulaciones genéticas *in vitro* suelen recibir el nombre de **organismos genéticamente modificados** (**GMO**, Genetically Modified Organisms), o *plantas GM*. Curiosamente, los organismos cuyas modificaciones se han realizado mediante métodos más tradicionales *in vivo* no suelen diseñarse de esta forma, y la mayor parte de los organismos que se utiliza en la industria, la agricultura y la medicina se han manipulado genéticamente. La diferencia estriba en que los que se han aislado después de utilizar técnicas *in vitro* contienen con frecuencia genes de otros organismos, es decir, son **organismos transgénicos**. Aunque las técnicas para generar *plantas transgénicas* o *animales transgénicos* son esencialmente las mismas que las que se utilizan para generar microorganismos que expresan genes foráneos, el uso del término «organismos transgénicos» se limita a los organismos multicelulares. En esta sección veremos la forma en la que el gen foráneo (a menudo denominado *transgen*) se inserta en el genoma de una planta, así como el modo en el que se utilizan las plantas transgénicas.

Vectores para clonar en plantas

La bacteria fitopatógena Gram negativa *Agrobacterium tumefaciens* contiene un gran plásmido denominado **plásmido Ti**, que es responsable de su virulencia. El plásmido contiene genes que movilizan el DNA para transferirlo a la planta (para obtener detalles sobre el proceso de evolución de la enfermedad y los mecanismos genéticos, *véase* la Sección 19.21). El segmento del DNA del plásmido Ti que de hecho se transfiere a la planta recibe el nombre de **T-DNA**. Las secuencias de los extremos del T-DNA son esenciales para la transferencia y el DNA que se va a transferir debe estar entre estos extremos. Se ha construido un tipo de vector que se utiliza para transferir genes a plantas y se denomina *vector binario*. La palabra *binario* significa que «consta de dos partes» y un plásmido binario implica el uso de dos plásmidos; uno es el vector real en el que se planta el DNA foráneo. Este vector contiene dos extremos del T-DNA a cada lado del sitio que se utiliza para la clonación, así como un marcador de resistencia a los antibióticos que puede utilizarse en plantas. También contiene un origen de replicación que puede replicarse tanto en *Agrobacterium tumefaciens* como en *Escherichia coli* (este último sirve como hospedador para trabajos de clonación), así como otro marcador de resistencia a los antibióticos que se expresa en las bacterias (*véase* Figura 31.11). El DNA que debe clonarse se inserta en el vector, que a continuación se transforma en *Escherichia coli*. Acto seguido se transfiere a *Agrobacterium tumefaciens* (normalmente por conjugación; *véase* Sección 10.9).

Este vector de clonación no contiene los genes necesarios para transferir el T-DNA a una planta, por lo que el *Agrobacterium tumefaciens* en el que se transfiera debe contener el otro miembro del sistema de vector binario. Este otro plásmido contiene la región de virulencia (*vir*) de un

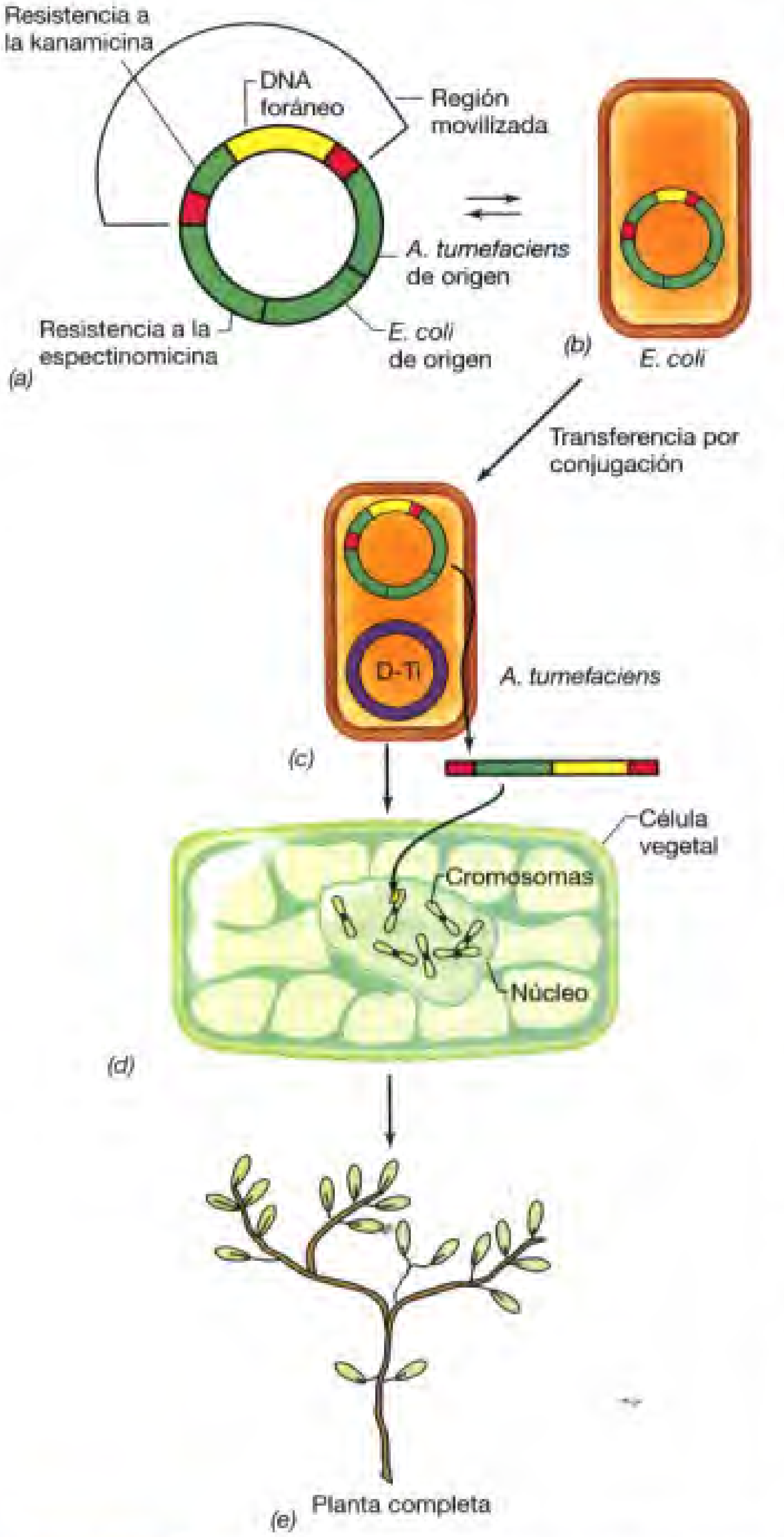


Figura 31.11 Producción de plantas transgénicas utilizando *Agrobacterium tumefaciens*. (a) Vector generalizado de clonación en plantas, que contiene extremos de T-DNA (en rojo), DNA foráneo (en amarillo), elementos de origen de replicación tanto para *Escherichia coli* como para *Agrobacterium tumefaciens*, y marcadores de resistencia a la espectinomicina y a la kanamicina. El marcador de resistencia a la kanamicina puede seleccionarse en plantas (b) El vector puede ponerse dentro de células de *Escherichia coli* con fines de clonación y, a continuación, transferirse ha *Agrobacterium tumefaciens* por conjugación. (c) El plásmido residente Ti, que se usa para transferir el vector a la planta (D-Ti), se somete a ingeniería genética para eliminar genes clave implicados en la patogeneidad. (d) Sin embargo, D-Ti puede movilizar la región T-DNA del vector para realizar la transferencia a las células vegetales que han crecido en cultivos de tejidos. A partir de una célula recombinante se pueden regenerar plantas completas.

plásmido Ti, pero está «desarmado». Aunque puede dirigir la transferencia de DNA en una planta, ya no tiene genes que provoquen una enfermedad. Este plásmido desarmado, D-Ti, proporcionará todos los genes necesarios para transferir el T-DNA desde el vector de clonación. El DNA clonado y el marcador de resistencia a la kanamicina del vector pueden movilizarse mediante el plásmido D-Ti y transferirse a una célula vegetal (*véase* Figura 31.11). Tras la recombinación con un cromosoma del hospedador, el DNA foráneo puede expresarse y conferir así nuevas propiedades a la planta. Muchos genes no se expresan de manera eficaz en las plantas, a menos que se clonen en un vector de expresión que contenga un promotor vegetal. Entre los promotores que se han utilizado para la construcción de vectores de expresión vegetales se incluyen los que se encuentran normalmente en el T-DNA y un promotor del virus del mosaico de la coliflor, un virus de plantas con DNA (*véase* Tabla 9.1).

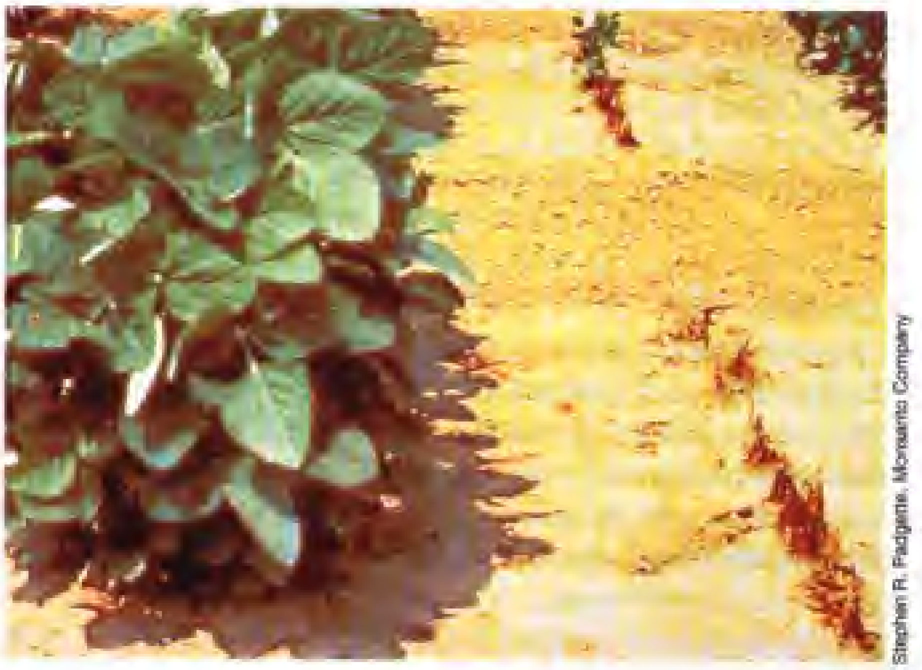
El uso de *Agrobacterium tumefaciens* ha permitido la creación de varias plantas transgénicas. Bien es verdad que se han obtenido más éxitos con plantas herbáceas (dicotiledóneas), tales como el tomate, la patata, el tabaco, la soja, la alfalfa y el algodón, pero *Agrobacterium tumefaciens* también se ha utilizado para producir dicotiledóneas leñosas, como puede ser el nogal o el manzano. Los cultivos de plantas transgénicas de la familia de las gramíneas (monocotiledóneas) han sido más difíciles de generar utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, pero parece que puede conseguirse buenos resultados con otros métodos de introducción del DNA, como es el disparador de partículas (*véase* Sección 31.2).

Aplicaciones en biotecnología vegetal

Las principales áreas de investigación para mejorar la genética de las plantas son la resistencia a los herbicidas, a los insectos y a las enfermedades microbianas, así como la mejora de la calidad del producto. Durante los últimos diez años se han realizado más de 1000 experimentos de campo distintos sobre más de 30 especies de plantas diferentes. La primera cosecha genéticamente codificada (cosecha GM) que se comercializó fue una plantación de tabaco de China, en el año 1992. Por su parte, en el año 2002 ya había más de 100 millones de acres (44 millones de hectáreas) de cosechas genéticamente modificadas esparcidas por todo el mundo. De éstas, el 58% eran plantaciones de soja, el 23%, de cereales, el 12%, de algodón y el 16% restante, de canola. Casi todas las cosechas de soja y canola GM plantadas eran resistentes a los herbicidas, mientras que las de cereales y algodón eran resistentes a los herbicidas, a los insectos o a ambos.

Resistencia a los herbicidas

La resistencia a los herbicidas puede obtenerse sometiendo a ingeniería genética la cosecha que ya no responde a los agentes químicos tóxicos. Muchos herbicidas actúan inhibiendo una de las enzimas principales de la planta o una proteína necesaria para el crecimiento. Por ejemplo, el herbicida *glifosato* mata las plantas, puesto que inhibe la actividad de una enzima necesaria para sintetizar aminoácidos aromáticos. Este tipo de herbicidas mata tanto las malas hierbas como las plantas de los diferentes cultivos y, en consecuencia, debe usarse como un herbicida preemergente, es decir antes de que éstos empiecen a crecer. Sin embargo,



Stephen R. Padgette, Monsanto Company

Figura 31.12 La fotografía muestra una porción de un campo de plantación de soja que se ha tratado con *Roundup*, un herbicida derivado del glifosato, fabricado en Monsanto. Las plantas de la derecha son sojas normales, mientras que las de la izquierda se han sometido a ingeniería genética para expresar resistencia al glifosato.

algunas bacterias contienen una enzima que es resistente al glifosato de forma natural. Se ha clonado un gen que codifica una enzima resistente del *Agrobacterium*, se ha modificado para que se pueda expresar en plantas y se ha transferido a plantas. Cuando se las pulveriza con el herbicida, las plantas que contienen el gen bacteriano crecen del mismo modo que las plantas control que no se han pulverizado (*véase* Figura 31.12). Monsanto Company ha desarrollado sojas que expresan la resistencia al glifosato.

Resistencia a los insectos y a los virus

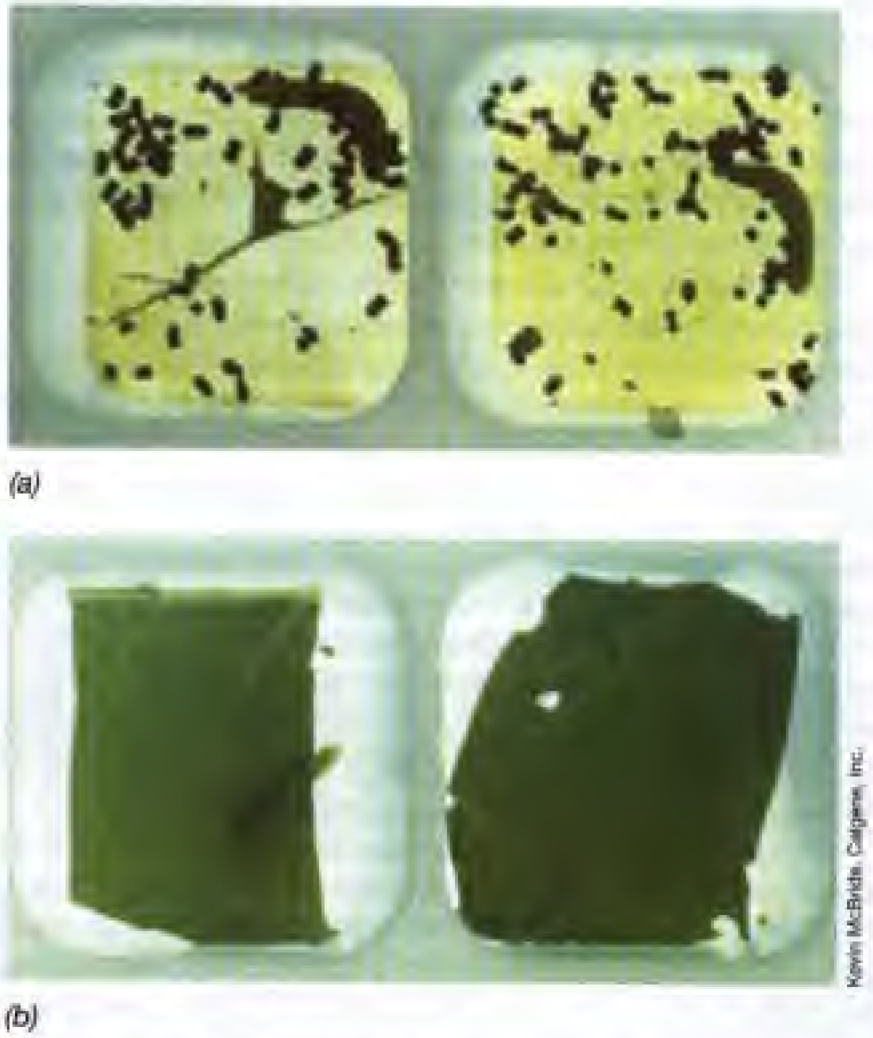
También se han introducido nuevos medios de resistencia a los insectos en las plantas mediante métodos genéticos. Uno de los que más se ha utilizado ha sido el gen de la proteína tóxica *Bacillus thuringiensis*. Este organismo produce una proteína cristalina (*véase* Sección 12.20), llamada *toxina-Bt*, que es tóxica para las larvas de las polillas y de las mariposas. Además, algunas cepas de esta proteína producen proteínas adicionales tóxicas para las larvas de escarabajos y moscas, así como para los mosquitos. Los biotecnólogos están siguiendo en la actualidad diversos métodos a fin de mejorar el uso de la toxina-Bt y controlar así las plagas de las plantas.

Uno de estos métodos consiste en desarrollar una única toxina-Bt que resulte eficaz frente a muchos insectos distintos. Esto puede conseguirse por el hecho de que la proteína tiene dominios separados para su especificidad y para su función tóxica. El dominio tóxico está altamente conservado en todas las toxinas-Bt. Los expertos en ingeniería genética pueden crear un gen que codifique una toxina-Bt, que lleve un dominio tóxico y varios dominios de especificidad diferentes. En la Sección 31.5 hablamos de la forma en la que tendríamos que modificar un gen a partir de un eucariota superior antes de que se pudiera expresar con eficacia en una bacteria. En ocasiones también es preciso modificar los genes bacterianos antes de expresarlos en un eucariota. Por ejemplo, los genes bacterianos pueden contener secuencias que provoquen una escisión accidental del mRNA; también puede ocurrir que el uso de codones no se haya realizado por la vía adecuada. Debido a todas las modificaciones necesarias, los genes de la toxina-Bt que se utilizan en la actualidad suelen ser completamente sintéticos.

Un método muy eficaz para conseguir la expresión y la estabilidad del gen consiste en transferir este gen directamente al genoma de la planta. Por ejemplo, se ha clonado el gen de una toxina-Bt natural en un plásmido vector bajo el control del promotor del rRNA del cloroplasto y se ha transferido a cloroplastos de plantas de tabaco mediante el bombardeo de partículas. Con este método, se han obtenido plantas que expresaban esta proteína a niveles que eran extremadamente tóxicos para las larvas de un buen número de especies de insectos (*véase* Figura 31.13).

Con todo, se sabe que hay insectos que han adquirido resistencia a la toxina-Bt. La resistencia a insecticidas y fungicidas es un problema muy habitual en la agricultura, y el hecho de que se haya fabricado un producto con ingeniería genética no le confiere propiedades mágicas. Esto demuestra que es preciso utilizar múltiples estrategias para controlar las plagas, así como que la toxina-Bt constituye únicamente una de las muchas que se han desarrollado en el campo de la biotecnología.

La ingeniería genética se ha utilizado también para proteger las plantas frente a las infecciones víricas. Por ejemplo,



Kevin McBride, Calgene, Inc.

Figura 31.13 El panel (a) muestra resultados de dos ensayos distintos para determinar el efecto de las larvas de la oruga negra sobre hojas de tabaco de plantas normales. El panel (b) muestra los resultados de ensayos similares, pero utilizando hojas de tabaco recogidas de plantas de tabaco transgénicas, que expresan la toxina-Bt en sus cloroplastos.

se ha descubierto que las plantas transgénicas que expresan el gen de la cubierta de la proteína de un virus se hacen resistentes a la infección con ese virus. Aunque se desconoce el mecanismo de resistencia, parece que la presencia de la proteína de la cubierta de virus en las células vegetales influye en la pérdida de la cubierta (decapsidación) de las partículas víricas, lo que su vez parece interrumpir el filtro de replicación del virus.

Otros usos de la biotecnología vegetal

No toda la ingeniería genética está dirigida a obtener plantas resistentes a las enfermedades. La ingeniería genética puede utilizarse de muchas maneras para desarrollar cepas mutantes de plantas con características deseadas. Por ejemplo, el primer alimento genéticamente modificado que salió a la venta en los Estados Unidos fue un tomate que tardaba más en estropearse. Además, las plantas transgénicas pueden someterse a ingeniería genética para conseguir productos comerciales farmacéuticos, tal como se ha hecho con los microorganismos (*véase* Sección 31.6) y los animales (*véase* Sección 31.8). Las plantas cultivadas, tales como el tabaco o los tomates, se han sometido a ingeniería genética para conseguir productos distintos, tales como la proteína humana interferón. Las plantas transgénicas cultivadas pueden utilizarse para producir anticuerpos animales de forma eficaz y barata, que reciben en ocasiones el nombre de «planticuerpos». Estos anticuerpos tienen un cierto potencial como agentes anticancerígenos o antivíricos, y algunos de ellos se encuentran en actualidad en el estadio de ensayos clínicos.

Los hospedadores vegetales pueden ser útiles para sintetizar estos tipos de productos, no sólo porque las plantas modifican las proteínas correctamente, sino porque, además, las plantas cultivadas pueden crecer y recolectarse con elevados rendimientos.

También se están desarrollando plantas de cultivo para la producción de vacunas. Por ejemplo, se ha fabricado por ingeniería genética un virus del mosaico de tabaco recombinante cuya cubierta contiene antígenos de *Plasmodium vivax*, el organismo que causa la malaria (*véase* Sección 27.5). Este virus recombinante podría utilizarse para desarrollar una vacuna contra la malaria, que podría fabricarse en grandes cantidades a muy bajo coste sólo con recolectar el tabaco que crece en los campos. Otro método muy interesante consiste en producir una vacuna en un producto vegetal comestible. Estas *vacunas comestibles* se encuentran en proceso de desarrollo, pero podrían ofrecer inmunización frente a enfermedades causadas por bacterias entéricas, incluidos el cólera y la diarrea (*véase* Sección 28.5).

Aunque la aceptación de las cosechas genéticamente modificadas sigue siendo muy alta en los Estados Unidos, recientemente han surgido preocupaciones al respecto, algunas de ellas procedentes de la identificación en alimentos humanos de cereales GM aprobados únicamente como alimento animal. En Europa esto ha despertado una expectación considerable en la opinión pública, de manera que algunos países han considerado la posibilidad de prohibir las cosechas GM o de elaborar una legislación que haga que todos los alimentos GM estén correctamente etiquetados. Esto significa, pues, que la ciencia y la viabilidad comercial potencial no garantizan siempre la aceptación por parte del público. De hecho, la preocupación de la opinión pública ha hecho que las cantidades de acres plantados con cosechas GM hayan descendido o incluso se hayan interrumpido por completo.

✓ 31.7 Revisión de conceptos

La ingeniería genética se está empleando para crear plantas resistentes a las enfermedades, para mejorar la calidad del producto, y para utilizar las plantas de cultivo como fuente de proteínas recombinantes o incluso de vacunas. Uno de los vectores de clonación que más se usa con las plantas es el plásmido Ti de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Este plásmido puede transferir DNA a células vegetales. Las plantas cuyo genoma se ha modificado utilizando técnicas genéticas *in vitro* reciben el nombre de *microorganismos genéticamente modificados* o GMO (por sus siglas en inglés).

- ✓ ¿A qué forma de transferencia de genes bacterianos se parece más la transferencia de DNA por parte del plásmido Ti (*véase* Capítulo 10)?
- ✓ ¿Qué es una *planta transgénica?*

31.8 Ingeniería genética en animales y en genética humana

En esta sección mostraremos tan sólo algunos de los muchos usos que puede tener la ingeniería genética en la genética animal y humana. Algunas de estas aplicaciones se refieren a la producción de sustancias, pero la mayoría de ellas pretenden comprender mejor la función génica de los mamíferos, o incluso curar o tratar enfermedades genéticas.

Animales transgénicos

Con el uso de la tecnología del DNA recombinante y las técnicas de microinyección para administrar genes clonados a huevos fertilizados, se han expresado muchos genes foráneos tanto en animales de laboratorio como en especies animales importantes para las industrias comerciales. Estos animales reciben el nombre de *animales transgénicos* y cada vez tienen más importancia en la investigación biomédica básica que pretende estudiar la regulación genética y la biología del desarrollo. No obstante, también resultan interesantes muchos otros aspectos aplicados de los animales transgénicos.

Uno de los métodos seguidos en este campo consiste en mejorar la productividad o la resistencia a las enfermedades del animal, como también ocurre en el caso de las plantas transgénicas usadas en la agricultura. Sin embargo, los animales transgénicos también se están utilizando para producir proteínas de valor farmacéutico (un proceso que algunos científicos denominan con el término inglés *pharming*). Los animales transgénicos pueden resultar útiles para producir proteínas humanas que requieren modificaciones específicas postraduccionales para tener actividad, como sucede con algunas enzimas de coagulación sanguínea, ya que los microorganismos o las plantas no son capaces de producir de forma activa muchas de las proteínas

Técnicas y Aplicaciones ... Huella dactilar del DNA

Las técnicas utilizadas en genética molecular y en ingeniería genética son útiles para determinar las relaciones evolutivas entre organismos. De hecho, dichas técnicas se utilizan hoy en día de forma habitual para distinguir entre individuos. Este proceso se conoce con el nombre de **huella dactilar del DNA**. La huella dactilar del DNA es posible gracias tanto a la tecnología que permite la detección precisa y la amplificación de pequeñas cantidades de DNA, como por el hecho de que los organismos superiores poseen secuencias repetitivas de DNA que existen en el genoma en diferente número y disposición.

Como ya hemos visto (*véase* Sección 7.4), los genomas de los eucariotas superiores obtienen una cantidad muy grande de DNA repetitivo. Algunas de estas repeticiones se producen en familias de secuencias relacionadas dispersas por todo el genoma, por lo que ha sido posible clonar y secuenciar miembros de estas familias. Para que sea útil con fines de identificación, una secuencia de DNA debe poder distinguirse entre grupos distintos dentro de una población de organismos. Se encontró que una familia de estas secuencias repetitivas no sólo variaba en cuanto a su secuencia, sino también en el número de repeticiones que se encontraban en el mismo sitio en un cromosoma determinado. Estas secuencias reciben el nombre de *número variable de repeticiones tándem* (VNTR, *Variable Number of Tandem Repeats*) y algunas de ellas se han identificado ya.

El uso de VNTRs en la huella dactilar del DNA se muestra en la Figura 1, en la que se presentan dos alelos diferentes (estados alternativos del mismo gen) de un cromosoma eucariótico, que difieren solamente en el número de copias de secuencias repetidas que hay. Como el DNA de VNTR se ha secuenciado, se sabe cuáles son los sitios para enzimas de restricción que *no* se encuentran en un determinado VNTR. A continuación, la digestión con estas enzimas libera el VNTR completo y entero. Cuando se digiere el DNA de dos cromosomas con diferente número de repeticiones en este locus particular, los fragmentos de restricción que contienen este DNA difieren en tamaño (esta diferencia se denomina *polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción*, o RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Este DNA puede separarse mediante electroforesis en gel, y los fragmentos que contienen VNTR pueden identificarse mediante la técnica conocida como *Southern blotting* (*véase* Sección 10.12), a través del uso de una sonda fabricada a partir de la secuencia del VNTR clonado. Aun cuando existan múltiples alelos en una población (en lugar de dos como en el ejemplo), las diferencias en un solo sitio son suficientes para identificar un individuo. Así, cabría esperar que muchos individuos de una población tuvieran el mismo patrón en este sitio. Sin embargo, es posible sondar el DNA digerido a la vez en varios marcadores de VNTR distintos. Con el uso de estos métodos, la probabilidad de identificar un individuo particular mediante la comparación de dos muestras distintas de DNA es extremadamente alta.

Téngase en cuenta que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; *véase* Sección 10.17) no necesita utilizarse en la huella dactilar del DNA. Sin embargo, el uso de la PCR resulta imprescindible cuando la cantidad de DNA de la muestra es muy pequeña (como la que se encuentra en las células de la raíz de un solo cabello). El uso de la PCR en la huella dactilar del DNA también se muestra en la figura. Para utilizar la PCR es necesario conocer las secuencias que rodean un sitio particular que contiene un VNTR, de modo que sea posible sintetizar los iniciadores. Sin embargo, como la PCR amplifica únicamente el DNA que se encuentra entre los iniciadores, no es preciso cortar el DNA con enzimas de restricción antes de introducirlo en un gel. Con una cantidad suficiente de ciclos de amplificación, en ocasiones también es posible detectar las bandas generadas por la PCR simplemente tiñendo los geles, en lugar de utilizar una sonda de hibridación.

Los VNTR no están limitados a organismos superiores. El genoma del *Bacillus anthracis*, la especie de bacteria que causa la enfermedad conocida como carbunco (*véase* Sección 25.11) contiene varios VNTR diferentes. Esto permite identificar y rastrear las cepas que se utilizan como armas biológicas. ■

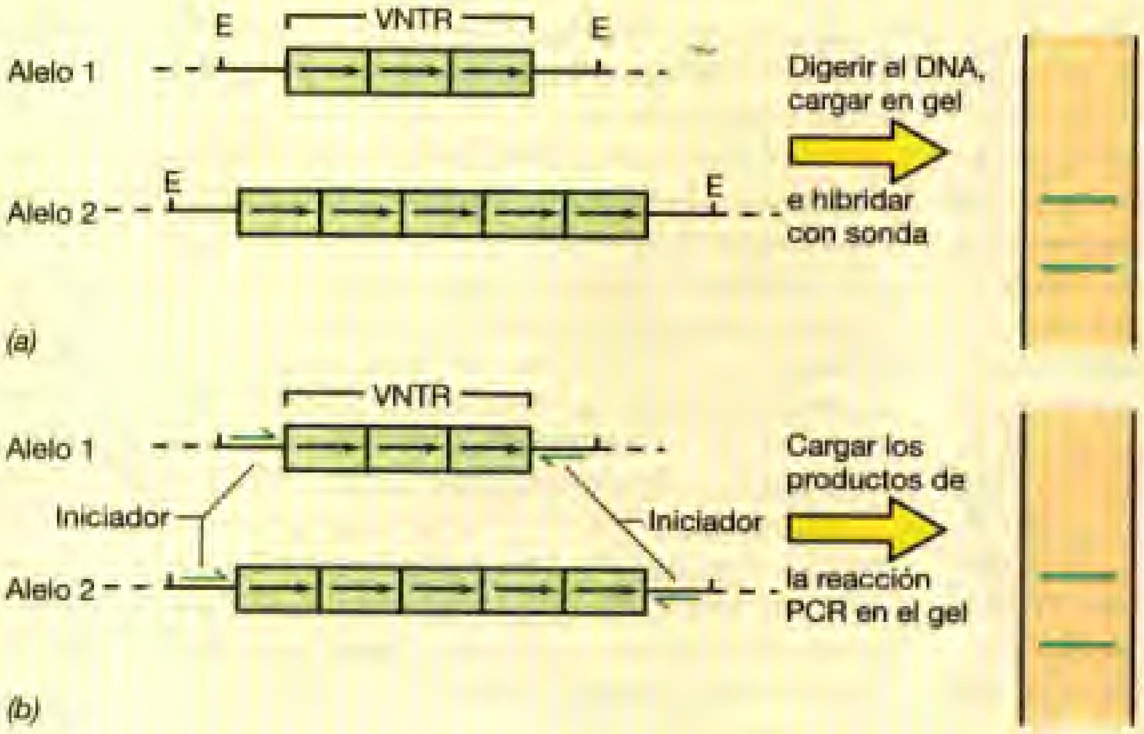


Figura 1 Huella dactilar del DNA. (a) Se analizan los alelos de la región de un solo cromosoma. Los alelos difieren únicamente en el número de repeticiones del VNTR. El DNA procedente de las células que contienen estos cromosomas puede cortarse con la enzima de restricción EcoRI (pero corta en el VNTR) y los fragmentos se separan en un gel de agarosa. Los fragmentos que contienen el VNTR se identifican después del *Southern blotting* mediante hibridación con una sonda específica para el VNTR. La figura muestra únicamente el resultado de los individuos cuyos dos cromosomas tienen alelos distintos en este sitio. Si el individuo tiene el mismo alelo en ambos cromosomas, sólo se observa una sola banda. (b) Los mismos alelos, pero con iniciadores que podían utilizarse para amplificar los segmentos de VNTR mediante la PCR. Los productos de la reacción PCR pueden cargarse directamente en el gel sin realizar una digestión con enzimas de restricción.

de este tipo. Asimismo, algunas proteínas se han sometido a ingeniería genética para que sean secretadas a la leche del animal, de modo que puedan recogerse y elaborarse fácilmente. Entre estas proteínas figura la α-1-antitripsina (usada para tratar enfermedades pulmonares), producida por las ovejas, y el activador tisular del plasminógeno (usado para disolver coágulos), producido por las cabras. La producción de animales transgénicos para la investigación científica y con fines comerciales continúa siendo una importante tarea de la biotecnología.

Genética humana

La genética convencional, que implica cruces genéticos o mutagénesis, no puede hacerse con seres humanos. Por lo tanto, hasta la revolución que provocó la ingeniería genética nuestro conocimiento de la genética humana se encontraba muy por detrás de nuestro conocimiento acerca de la genética de muchos otros organismos. Una descripción detallada sobre la genética humana superaría el ámbito de este libro, si bien podemos hacer algunas consideraciones generales acerca de la utilidad de la tecnología del DNA recombinante.

En el Capítulo 15 mencionamos que en el año 2000 se consiguió un primer borrador de la secuencia del genoma humano. Bien es verdad que aún queda una gran cantidad de trabajo por hacer antes de completar todas las secuencias, pero este borrador facilita considerablemente los estudios que intentan comprender la estructura y el funcionamiento de los genes humanos. En cualquier caso, y al igual que sucede con otras áreas de la genómica, la secuencia del genoma humano tendrá multitud de aplicaciones prácticas.

TUTORÍA Huella dactilar del DNA

En la actualidad ya se están utilizando técnicas de ingeniería *in vitro* para identificar individuos en un proceso llamado **huella dactilar del DNA** (consultar el recuadro sobre la huella dactilar del DNA). Uno de los objetivos principales de la secuenciación del genoma humano es comprender mejor las enfermedades genéticas. Por ello, algunas de las aplicaciones de la ingeniería genética del genoma humano están encaminadas a tratar algunas enfermedades humanas.

Hasta la fecha se conoce un gran número de enfermedades genéticas pero, a excepción de algunos casos, hasta hace muy poco no se sabía apenas nada de su base molecular. Mediante el uso de la tecnología del DNA recombinante, unido a los estudios genéticos convencionales (de acuerdo con la herencia familiar, etc.), es posible localizar defectos concretos en cromosomas determinados y en ubicaciones concretas de dichos cromosomas. Con el uso de la tecnología del DNA recombinante, es posible clonar la región que contiene el defecto genético para, a continuación, realizar comparaciones entre la secuencia básica del gen normal y el gen defectuoso. A partir de dichos estudios, aun cuando no se conozca el defecto enzimático, ha sido posible obtener información acerca del cambio genético. Muchos genes, incluidos los de la enfermedad de Huntington, la fibrosis quística o la distrofia muscular de Duchenne, se han localizado con estas técnicas, lo que ha permitido identificar las mutaciones de los genes defectuosos identificados.

Terapia génica

La ingeniería genética se emplea para intentar conseguir un tratamiento para algunas de estas enfermedades, utilizando la llamada **terapia génica**. En la terapia génica se amplifica un gen no funcional o disfuncional, o se reemplaza por un gen funcional. No toda la terapia génica esta diseñada para el tratamiento de enfermedades genéticas; de hecho, se ha realizado un considerable esfuerzo para establecer algún protocolo que permita tratar el cáncer. Los obstáculos más importantes que presenta este método surgen al tratar de encontrar las células correctas para la terapia génica, así como al intentar transfectar con éxito líneas celulares que perpetúen la alteración genética.

La primera enfermedad genética para la que se utilizó una técnica aprobada de terapia génica fue una grave deficiencia inmunitaria combinada, que tiene su causa en la deficiencia de adenosinadeaminasa (ADA), una enzima que participa en el metabolismo de las purinas de la médula ósea. El procedimientos consistía en utilizar un retrovirus como vector para insertar una copia correcta del gen de ADA en los linfocitos T (células que forman parte del sistema inmunitario; *véase* Sección 22) recogidos del paciente para, a continuación, colocar estas células «corregidas» en el cuerpo (el retrovirus también lleva un gen marcador de resistencia a la neomicina, por lo que las células que llevan el retrovirus insertado pueden seleccionarse e identificarse). Como los linfocitos T tienen una vida limitada, es necesario repetir la terapia todos los meses, o al menos cada dos meses. Se están realizando intentos para insertar el gen en las células germinales de la médula ósea (que continúan dividiéndose) y efectuar una verdadera curación de la enfermedad.

En la actualidad se están comprobando otros tratamientos de terapia génica, algunos de los cuales usan otros virus como vectores. Desde el primer experimento de terapia génica realizado con ADA en 1990, no hubo avances prácticos notables hasta el año 2000. Otra forma de deficiencia inmunitaria combinada, que implica un gen distinto, se trató con éxito en tres pacientes distintos. Parece posible que esta forma tan extraña de la enfermedad pueda tratarse con éxito utilizando la terapia génica. Aunque la terapia génica tiene un potencial práctico tremendo, la mayor parte de las aplicaciones sigue siendo tan sólo un proyecto en la distancia.

Algunas de las dificultades que existen en la actualidad se encuentran relacionadas con los vectores que se están utilizando. Aunque la transducción que utiliza vectores de retrovirus ofrece una integración estable del gen, el sitio de inserción no se puede predecir, la cantidad de DNA clonado es limitada y la expresión del gen clonado es a menudo transitoria. Los vectores también tienen una capacidad de infección limitada, por lo que quedan desactivados rápidamente dentro del hospedador. Muchos vectores que no proceden de retrovirus, tales como el vector del adenovirus (*véase* Sección 16), tienen problemas similares; además, las reacciones adversas al vector pueden constituir un grave problema. Los vectores más prometedores incluyen los cromosomas humanos artificiales y las versiones altamente modificadas del virus del SIDA (*véanse* Secciones 9.12 y 16.14).

Es importante señalar que en los protocolos que se están comprobando el gen defectuoso no se reemplaza. En su lugar, el retrovirus, y la copia correcta del gen, simplemente se integran en algún lado del genoma humano de estas células. La sustituciones reales de los genes en las líneas celulares germinales (células que dan lugar a gametos) pueden realizarse con algunos mamíferos, aunque las técnicas de aislamiento de animales individuales con estos cambios no pueden aplicarse sin más en humanos. Además, los intentos de cambiar las células germinales de un individuo levantarían muchas cuestiones éticas y sociales más allá de las simples preguntas relativas al protocolo del experimento.

✓ 31.8 Revisión de conceptos

La ingeniería genética puede utilizarse para desarrollar animales transgénicos capaces de producir proteínas de valor farmacéutico. Las técnicas de ingeniería genética también se aplican para identificar individuos utilizando la huella dactilar del DNA. Una de las grandes promesas de la ingeniería genética es la terapia génica, que permite crear copias correctas de un gen en un individuo para tratar una enfermedad genética humana.

- ✓ ¿En qué consiste el fenómeno conocido como *pharming?*
- ✓ Una persona tratada con éxito con la terapia génica seguirá teniendo una copia defectuosa del gen. Explique por qué.

Preguntas de repaso

1. La ingeniería genética depende de muchas técnicas genéticas *in vitro* distintas. Describa las técnicas que se utilizan en la clonación molecular. Incluya en su descripción los términos «vector de clonación», «endonucleasas de restricción» y «transformación».
2. La técnica conocida como PCR tiene numerosas aplicaciones en la ingeniería genética. ¿Qué significan las letras del acrónimo? Describa la forma en la que se lleva a cabo la PCR.
3. Explique las similitudes y las diferencias que existen entre vectores de expresión, vectores lanzadera y vectores de integración.
4. ¿Qué es un *gen indicador?*
5. Explique las razones por las que el uso de un interruptor regulador es conveniente para la producción a gran escala de una proteína.
6. ¿Cómo se ha utilizado el bacteriófago T7 para expresar genes foráneos en *Escherichia coli* y qué características deseables posee este sistema regulador?
7. ¿Qué es una vacuna de subunidad y por qué las vacunas de subunidad se consideran un medio más seguro para conferir inmunidad frente a patógenos víricos que las vacunas de virus atenuadas?
8. ¿Qué es el plásmido Ti y cómo se ha utilizado en la ingeniería genética?
9. ¿En qué medida difieren las plantas y los animales transgénicos de las plantas y animales modificados mediante técnicas de cultivo o cría convencionales?
10. ¿Qué ventajas puede tener el uso de una planta transgénica frente al uso de un animal transgénico para producir una proteína?

Ejercicios prácticos

1. Suponga que le encargan la construcción de un plásmido que puede utilizarse para la clonación molecular en un organismo de interés industrial. Haga una lista de las características que debe tener este plásmido. Enumere los pasos que tendría que dar para desarrollar este plásmido.
2. Suponga que acaba de determinar la secuencia básica del DNA de un promotor especialmente fuerte en *Escherichia coli* y que está interesado en incorporar esta secuencia en un vector de expresión. Describa los pasos que daría. ¿Qué precauciones serían necesarias para asegurarse de que este promotor funciona realmente como se espera en su nueva ubicación?
3. La creación de bibliotecas de cDNA a partir de células que se han sometido a una respuesta reguladora concreta puede ser un potente método para detectar los genes implicados. Sin embargo, hasta la fecha ha sido mucho más fácil aislar el mRNA que no está contaminado con otros tipos de RNA (por ejemplo, rRNA y tRNA) de los eucariotas que de los procariotas. La técnica utilizada en los eucariotas es «positiva», puesto que el mRNA se aísla directamente. En los procariotas, las técnicas implican la eliminación de otros RNA. Describa la forma en la que aislaría el mRNA de los eucariotas. ¿Por qué este método no se utiliza con el mRNA procariótico?
4. Acaba de descubrir una proteína en los ratones que puede ser una cura eficaz para el cáncer, pero está presente únicamente en cantidades extremadamente pequeñas. Describa los pasos que daría para obtener la producción de esta proteína en *Escherichia coli.* Si la proteína producida en *Escherichia coli* demuestra ser sólo mínimamente eficaz en los ensayos clínicos, ¿qué haría para encontrar una proteína que tuvieran un eficacia mayor?
5. La terapia génica se utiliza para tratar a personas que tienen una enfermedad genética y, en caso de tener éxito, para curarlas. Sin embargo, estas personas seguirán transmitiendo la enfermedad a su descendencia. Explique las razones. ¿Por qué cree que esto pueda ser un área de investigación que no atraiga tanto como el tratamiento del individuo?

Apéndice 1

Cálculos de energía en bioenergética microbiana

La información contenida en este Apéndice pretende servir de ayuda para calcular los cambios de energía libre que acompañan a las reacciones químicas que realizan los microorganismos. Comienza con definiciones de los términos que se requieren para realizar tales cálculos y considera después cómo se necesita conocer el potencial redox, el equilibrio atómico y de carga, y otros factores, para resolver adecuadamente problemas de energía libre.

Definiciones

1. ΔG° = cambio de energía libre estándar de la reacción a 1 atm de presión y 1 *M* de concentración; ΔG = cambio de energía libre bajo las condiciones especificadas; ΔG = cambio de energía libre bajo condiciones estándar a pH7.
2. Cálculo de ΔG° para una reacción química a partir de la energía libre de formación, ΔG_f° de sustancias reaccionantes y productos:

   $$\Delta G^{\circ} = \Sigma\ \Delta G_f^0\ (\text{productos}) - \Sigma\ \Delta G_f^0\ (\text{reaccionantes})$$

   Es decir, sumar la G_f° de los productos, sumar la G_f° de los reaccionantes y restar el último valor del primero.
3. Conversión de condiciones estándar (pH 0) a condiciones bioquímicas (pH 7) en reacciones de producción de energía que incluyen H^+:

   $$\Delta G^{0\prime} = \Delta G^0 + m\ \Delta G'_f(H^+)$$

   donde *m* es el número neto de protones en la reacción (*m* es negativo cuando se consumen más protones de los que se forman) y G'_f (H^+) es la energía libre de formación de un protón a pH 7 = −39,87kJ a 25°C.
4. Efecto de la concentración sobre ΔG: con sustratos solubles, la relación entre las concentraciones de los productos formados y de los sustratos exógenos usados es normalmente igual o mayor que 10^{-2} al principio del crecimiento e igual o menor que 10^{-2} al final del crecimiento. A partir de la relación existente entre ΔG y la constante de equilibrio (*véase* punto 8) se puede calcular que en situaciones prácticas el cambio de energía libre difiere, cuando mucho, en 11,7 kJ del cambio de energía libre bajo condiciones estándar, es decir, en una cantidad más bien pequeña, por lo que como primera aproximación se puede usar la energía libre estándar en la mayor parte de los casos. Sin embargo, con H_2 como producto, la presencia de bacterias consumidoras de H_2 puede mantener la concentración de H_2 tan baja que el resultado final de la energía libre se vea significativamente afectado. Por ejemplo, en la fermentación de etanol a acetato y H_2 ($C_2H_5OH + H_2O\ C_2H_3O_2^- + 2H_2 + H^+$), la $\Delta G^{\circ\prime}$ a 1 atm de H_2 es 9,68 kJ pero a 10^{-4} atm de H_2 es −36,03 kJ. Por consiguiente, en presencia de bacterias que consumen H_2, la fermentación de etanol se vuelve útil (*véase* también punto 9).
5. Potenciales de reducción: convencionalmente, las ecuaciones redox se escriben en la dirección oxidante + ne^- → reductor (es decir, como reducciones), donde *n* es el número de electrones transferidos. El potencial estándar (E_o) del hidrógeno, $2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$, se fija por definición como *V* a 1,0 atm de presión de gas H_2 Y 1,0 *M* H^+ a 25°C. E'_o es el potencial estándar de reducción a pH 7. *Véase* también la Tabla A1.2.
6. Relación entre la energía libre y el potencial de reducción:

   $$\Delta G^{0\prime} = -nF\ \Delta E'_o$$

   donde n es el número de electrones transferidos, F es la constante de Faraday (96,48 kJ/V), y E'_0 es el valor resultante de restar del $\Delta E'_o$ del par que acepta los electrones el E'_o del par donador de electrones.
7. Constante de equilibrio, *K*. Para la reacción general $aA + bB \rightleftharpoons cC + dD$,

   $$K = \frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b}$$

   donde A, B, C y D representan reaccionantes y productos y *a*, *b*, *c* y *d* el número de moléculas en cada caso. Los paréntesis indican concentraciones. Esto sólo se cumple cuando el sistema químico está en equilibrio.
8. Relación entre la constante de equilibrio, *K*, y el cambio de energía libre. A temperatura y presión constantes,

   $$\Delta G = \Delta G^0 + RT\ \text{In}\ K$$

   donde *R* es una constante (8,29 J/mol/K) y *T* es la temperatura absoluta (K).
9. Dos sustancias pueden reaccionar en una reacción redox incluso si sus potenciales estándar no son favorables con tal de que las concentraciones sean las apropiadas.

Supongamos que la forma reducida de A cede normalmente electrones a la forma oxidada de B. Sin embargo, si la concentración de la forma reducida de A fuera baja y la concentración de la forma reducida de B fuera alta, sería posible que la forma reducida de B cediera electrones a la forma oxidada de A. Por tanto, la reacción tendría lugar en dirección opuesta a la predicha a partir de los potenciales estándar. Un ejemplo práctico de esto es la utilización de H^+ como aceptor de electrones para producir H_2. Normalmente, la producción de H_2 por bacterias fermentativas no es grande debido a que H^+ es un aceptor débil de electrones; el E'_o del par $2H^+/H_2$ es −0,42 V. Sin embargo, si la concentración de H, se mantiene baja por una extracción continua (un proceso que pueden hacer los procariotas metanogénicos, que usan $H_2 + CO_2$ para producir metano, CH_4, o muchos otros anaerobios capaces de consumir H_2 anaeróbicamente), el potencial será más positivo y entonces H^+ servirá como un aceptor de electrones adecuado.

Estado o número de oxidación

1. El estado de oxidación de un elemento en una sustancia elemental (como por ejemplo H_2, O_2) es cero.
2. El estado de oxidación del ion de un elemento es igual al de su carga (por ejemplo, $Ha^+ = +1$; $Fe^{3+} = +3$; $0^{2-} = -2$).

3. La suma de los números de oxidación de todos los átomos en una molécula neutra es cero. Así, H_2O es neutra porque tiene dos H con +1 cada uno y un O con −2.
4. En un ion, la suma de los números de oxidación de todos los átomos es igual a la carga del ion. Así, en el ion OH^-, O(−2) + H(+1) = −1.
5. En compuestos, el estado de oxidación del O es casi siempre −2 y el de H es +1.
6. En compuestos carbonados simples, el estado de oxidación de C se puede calcular sumando los átomos de H y O presentes y usando los estados de oxidación de estos elementos como se indica en el punto 5, ya que en un compuesto neutro la suma de todos los números de oxidación debe ser cero. Por ejemplo, el estado de oxidación del carbono en el metano, CH_4, es −4 (4 H^+ a +1 cada uno = +4); en el dióxido de carbono, CO_2 el estado de oxidación del carbono es +4 (2 O a −2 cada uno = −4).
7. En los compuestos orgánicos con más de un átomo de C, puede que no sea posible asignar a cada átomo de C un número de oxidación específico, pero es útil calcular el estado de oxidación del compuesto en su conjunto. Se usan las mismas convenciones. Así, el estado de oxidación del carbono en la glucosa, $C_6H_{12}O_6$, es cero (12 H a +1 = 12; 6 O a −2 = −12) y en el etanol, C_2H_6O, es −4 (6 H a +1 = 6; un O a −2).
8. En toda reacción de oxidación-reducción hay un equilibrio entre los productos oxidados y reducidos. Para calcular un equilibrio de oxidación-reducción, se multiplica el número de moléculas de cada producto por su estado de oxidación. Por ejemplo, en la fermentación alcohólica hay dos moléculas de etanol a −4 = −8 y dos moléculas de CO_2 a +4 = +8, de modo que el balance neto es cero. Cuando se diseñan reacciones modelo es útil calcular los equilibrios redox para estar seguros de que la reacción es posible.

Determinación de balances de energía libre en reacciones hipotéticas

La energía final se puede calcular a partir de las energías libres de formación de los reaccionantes y productos o a partir de las diferencias en los potenciales de reducción de las reacciones parciales de cesión y ganacia de electrones

Cálculos a partir de la energía libre

Las energías libres de formación se presentan en la Tabla A1.1. A continuación se indica el procedimiento para el cálculo de los valores de energía libre.

1. *Ajuste de las reacciones.* En todos los casos es esencial comprobar que la reacción de óxido-reducción acoplada está equilibrada. El ajuste implica tres cosas: *(a)* el número total de átomos de cada clase debe ser idéntico a ambos lados de la ecuación; *(b)* debe haber un equilibrio iónico, es decir, que cuando se añadan iones positivos o negativos al lado derecho de la ecuación, la carga iónica total (positiva, negativa o neutra) equilibre exactamente la carga iónica del lado izquierdo de la ecuación; y (*c*) debe existir un ajuste en la oxidación-reducción de modo que todos los electrones cedidos por una sustancia deben ser transferidos a otra sustancia. En general, cuando se ajustan las reacciones se sigue el orden inverso a los pasos indicados. Normalmente, si los pasos *(b)* y *(c)* han sido efectuados de modo apropiado, el paso *(a)* es automáticamente correcto.
2. *Ejemplos. (a)* ¿Cuál es la reacción ajustada para la oxidación de H_2S a SO_4^{2-} con O_2? Primero, determinamos cuantos electrones están implicados en la oxidación de H_2S a SO_4^{2-}. Esto se puede deducir fácilmente de los estados de oxidación de los compuestos, usando las reglas dadas anteriormente. Como H tiene un estado de oxidación de +1, el estado de oxidación de S en H_2S es −2. Como O tiene un estado de oxidación de −2, el estado de oxidación de S en SO_4^{2-} es +6 (como es un ion hay que usar las reglas 4 y 5 del epígrafe anterior). Por tanto, la oxidación de H_2 a SO_4^{2-} equivale a una transferencia de 8 electrones (de −2 a +6). Como cada átomo O puede aceptar dos electrones (el estado de oxidación del O en O_2 es cero, pero en H_2O es −2) esto significa que se requieren dos moléculas de oxígeno molecular, O_2, para satisfacer la capacidad suficiente de aceptar electrones. Así, hasta ahora, sabemos que la reacción requiere 1 H_2S y 2 O_2 en el lado izquierdo de la ecuación, y 1 SO_4^{2-} en el lado derecho. Para tener un ajuste iónico debemos tener dos cargas positivas en el lado derecho de la ecuación para equilibrar las dos cargas negativas de SO_4^{2-}. En consecuencia, añadiremos $2H^+$ al lado derecho de la ecuación, quedando la reacción global

$$H_2S + 2\,O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + 2\,H^+$$

Puede comprobarse que esta ecuación está también ajustada en lo que se refiere al número total de átomos de cada clase en cada lado de la ecuación.

(*b*) ¿Cuál es la reacción ajustada de la oxidación de H_2S a SO_4^{2-} con Fe^{3+} como aceptor de electrones? Acabamos de deducir que la oxidación de H_2S a SO_4^{2-} es una transferencia de ocho electrones. Como la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} implica solo la transferencia de un electrón, se requerirán 8 Fe^{3+}. Hasta aquí la reacción aparecerá como

$$H_2S + 8\,Fe^{3+} \rightarrow 8\,Fe^{2+} + SO_4^{2-} \qquad \text{(no ajustada)}$$

Como se aprecia, el equilibrio iónico no es correcto. Tenemos 24 cargas positivas en la izquierda y 14 cargas positivas a la derecha (16+ del Fe, 2− del sulfato). Para igualar las cargas, añadimos 10 H^+ a la derecha, de modo que la ecuación adquiere ahora esta forma

$$H_2S + 8\,Fe^{3+} \rightarrow 8\,Fe^{2+} + 10\,H^+ + SO_4^{2-} \qquad \text{(no ajustada)}$$

Para aportar los hidrógenos necesarios para H^+ y el oxígeno para el sulfato, añadimos 4 H_2O a la izquierda y encontramos que la reacción queda ahora ajustada

$$H_2S + 4\,H_2O + 8\,Fe^{3+} \rightarrow 8\,Fe^{2+} + 10\,H^+ + SO_4^{2-} \qquad \text{(ajustada)}$$

En general, en las reacciones microbiológicas el balance iónico se consigue mediante adición de H+ o OH− al lado izquierdo o derecho de la ecuación, y como todas las reacciones tienen lugar en medio acuoso, se añaden moléculas de H_2O donde se necesite. La adición de

TABLA A1.1. Energias libres de formación, G_f^0, para algunos compuestos (kJ/mol)[a]

Compuesto carbonado	Metal	No metal	Compuesto nitrogenado
CO, −137,34	Cu^+, +50,28	H_2, 0	N_2, 0
CO_2, −394,4	Cu^{2+}, +64,94	H^+, 0 a pH 0;	NO, +86,57
CH_4, −50,75	CuS, −49,02	−39,83 a pH 7	NO_2, +51,95
H_2CO_3, −623,16	Fe^{2+} −78,87	(−5,69 per pH unit)	NO_2^- −37,2
HCO_3^-, −586,85	Fe^{3+} −4,6	O_2, 0	NO_3^- −111,34
CO_3^{2-}, −527,90	$FeCO_3$, −673,23	OH^- − 157,3 a pH 14	NH_3, −26,57
Acetato, −369,41	FeS_2, −150,84	−198,76 a pH 7	NH_4^+, −79,37
Alanina, −371,54	$FeSO_4$, −829,62	−237,57 a pH 0	N_2O, + 104,18
Aspartato, −700,4	PbS, −92,59	H_2O, −237,17	
Ácido benzoico, −245,6	Mn^{2+}, −227,93	H_2O_2, −134,1	
Butirato, −352,63	Mn^{3+}, −82,12	PO_4^{3-} −1026,55	
Caproato, −335,96	MnO_4^{2-} −506,57	Se^0, 0	
Citrato, −1168,34	MnO_2, −456,71	H_2Se, −77,09	
Crotonato, −277,4	$MnSO_4$, −955,32	SeO_4^{2-}, −439,95	
Cisteína, −339,8	HgS, −49,02	S^0, 0	
Etanol, −181,75	MoS_2, −225,42	SO_3^{2-}, −486,6	
Formaldehído, −130,54	ZnS, −198,60	SO_4^{2-}, −744,6	
Formato, −351,04		$S_2O_3^{2-}$, −513,4	
Fructosa, −915,38		H_2S, −27,87	
Fumarato, −604,21		HS^-, +12,05	
Gluconato, −1128,3		S^{2-}, +85,8	
Glucosa, −917,22			
Glutamato, −699,6			
Glicerato, −658,1			
Glicerol, −488,52			
Glicina, −314,96			
Glicolato, −530,95			
Guanina, +46,99			
Lactato, − 517,81			
Lactosa, −1515,24			
Malato, −845,08			
Manitol, −942,61			
Metanol, −175,39			
Oxalato, −674,04			
Fenol, −47,6			
n-Propanol, −175,81			
Propionato, −361,08			
Piruvato, −474,63			
Ribosa, −757,3			
Succinato, −690,23			
Sacarosa, −370,90			
Urea, −203,76			
Valeriato, −344,34			

[a] Los valores de energía libre de formación para varios compuestos se pueden hallar en Dean, J. A. *1973. Lange's Handbook of Chemistry*, 11.ª edición. Me GrawHill, New York; Garrels, R. M. y C. L. Christ, 1965. *Solutions, Minerals and Equilibria.* Harper and Row, New York; Burton, K. *1957.* En Krebs, H. A. y H. L. Kornberg. Energy transfomations in living matter, *Ergebnisse der Physiologie* (apéndice). Springer-Verlag, Berlin; y Thauer, R. K., K. Jungermann y H. Decker. 1977. Energy conservation in anaerobic chemotrophic bacteria, *Bacteriol. Rev. 41:* 100-180.

H^+ o OH^- depende generalmente de si la reacción ocurre en condiciones ácidas o alcalinas.

3. *Determinación de la energía resultante a partir de las energías libres deformación en ecuaciones ajustadas.* Una vez que una reacción ha sido ajustada se puede obtener la energía libre resultante insertando los valores de energía libre de formación de cada reaccionante y producto indicados en la Tabla A1.1 y usando la fórmula del punto 2 de la primera sección de este apéndice.

Por ejemplo, en la ecuación

$$H_2S + 2\,O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + 2\,H^+$$

$$G_f' \text{ valores} \rightarrow (-27{,}87) + (0)\quad (-744{,}6) + 2\,(-39{,}83)$$

(suponiendo pH 7)

$$\Delta G^{0\prime} = -796{,}39 \text{ kJ/mol}$$

Se suman los valores de la derecha y se restan los de la izquierda, teniendo cuidando en asegurarse de la corrección de los signos. A partir de los datos de la Tabla A1.1 se puede calcular la energía libre resultante de una gran variedad de reacciones de interés microbiológico.

Cálculos a partir del potencial de reducción

En la Tabla A1.2 se dan los potenciales de reducción de algunos pares redox importantes. La cantidad de energía que se puede liberar de dos semireacciones acopladas se puede calcular de las diferencias de los potenciales de reducción de las dos reacciones y del número de electrones transferidos. Cuanto mayor sea la diferencia entre las dos semirreacciones y mayor sea el número de los electrones, mayor será la cantidad de energía liberada. La conversión de diferencia de potencial a energía libre viene dada por la fórmula $\Delta G° = -nF\,E'_o$, donde n es el número de electrones, F es la constante de Faraday (96,48 kJ/V) y E'_o es la diferencia entre los potenciales. Así, el par $2H^+/H_2$ tiene un potencial de −0,41 y el par $1/2\,O_2/H_2O$ tiene un potencial de +0,82, de modo que que la diferencia de potencial es 1,23, la cual es equivalente (porque hay dos electrones en juego) a una energía libre resultante ($\Delta G°$) de −237,34 kJ/mol. Por otro lado, la diferencia de potencial entre las reacciones $2H^+/H_2$ y NO_3^-/NO_2^- es menor, 0,84V, que equivale a una energía libre resultante de −162, 08 kJ/mol.

Como muchas reacciones bioquímicas son transferencias de dos electrones, es a menudo útil dar las energías resultantes para reacciones con dos electrones aun cuando estén implicados más electrones. Por ejemplo, el par redox SO_4^{2-}/H_2 implica ocho electrones, y la reducción completa de SO_4^{2-} con H_2 requiere $4H_2$ (equivalente a ocho electrones). De la diferencia de potencial entre $2H^+/H_2$ y SO_4^{2-}/H_2S (0,19V), se puede calcular una energía libre resultante de −146,64 kJ, o −36,66 M por cada dos electrones. Por convención, los potenciales de reducción se dan para condiciones en que están presentes concentraciones iguales de formas oxidadas y reducidas. En la práctica real, las concentraciones de estas dos formas puede ser muy diferente. Como se comentó antes en este apéndice (punto 9 de la primera sección), es posible acoplar semirreacciones incluso si la diferencia de potencial es desfavorable, con tal de que las concentraciones de las especies reaccionantes sea la adecuada.

TABLA A1.2. Potenciales de reducción de importancia microbiológica[a]

Redox pair	E'_0 (V)
SO_4^{2-}/HSO_3^-	−0.52
CO_2/formiato$^-$	−0.43
$2\,H^+/H_2$	−0.41
$S_2O_3^{2-}/HS^- + HSO_3^-$	−0.40
Ferredoxina ox/red	−0.39
Falvodoxina ox/red[b]	−0.37
NAD+/NADH	−0.32
Citocromo c_3 ox/red	−0.29
CO_2/acetato$^-$	−0.29
S^0/HS^-	−0.27
CO_2/CH_4	−0.24
FAD/FADH	−0.22
SO_4^{2-}/HS−	−0.217
Acetaldehído/etanol	−0,197
Piruvato$^-$/lactato$^-$	−0.19
FMN/FMNH	−0.19
Díhidroxiacetona fosfato/glicerofosfato	−0.19
$HSO_3^-/S_3O_6^{2-}$	−Q17
Falvodoxina ox/red[b]	−0.12
HSO_3^-/HS^-	−0.116
Menaquinona ox/red	−0.075
APS/AMP + HSO_3^-	−0,060
Tubredoxina ox/red	−0.057
Acrylyl−CoA/propionyl−CoA	−0.015
Glicina/acetato$^-$ + NH_4^+	−0.010
$S_4O_6^{2-}/S_2O_3^{2-}$	+0.024
Fumarato^{2-}/succinato^{2-}	+0.033
Citocromo *b* ox/red	+0.035
Ubiquinona ox/red	+0.113
AsO_4^{3-}/AsO_3^{3-}	+0.139
Dimetil sulfóxido (DMSO)/Dimetilsulfuro (DMS)	+0.16
$Fe(OH)_3 + HCO_3^-/FeCO_3$	+0.20
$S_3O_6^{2-}/S_2O_3^{2-} + HSO_3$	+0.225
Citocromo c_1 ox/red	+0.23
NO_2^-/NO	+0.36
Citocromo a_3 ox/red	+0.385
NO_3^-/NO_2^-	+0.43
SeO_4^{2-}/SeO_3^{2-}	+0.475
Fe^{3+}/Fe^{2+}	+0.77
Mn^{4+}/Mn^{2+}	+0.798
O_2/H_2O	+0,82
NO/N_2O	+1.18
N_2O/N_2	+1.36

[a] Datos tomados de Thauer, R. K., K. Jungermann y K. Decker, 1977. Energy conservation in anaerobic chemotrophic bacteria. *Bacteriol. Rev.* *41*: 100-180.

[b] En estas transferencias posibles de dos electrones se dan por separado los potenciales para cada transferencia electrónica.

Apéndice 2 Manual de Bergey de bacteriología sistemática, segunda edición

VOLUMEN 1
Las *Archaea*, Cianobacterias, Fototrofos y géneros de las ramas produndas de *Bacteria*

LAS ARQUEAS

Phylum I: *Crenarchaeota*	
SECCIÓN I Thermoprotei, sulfolobi and barophiles	
Clase I: *Thermoprotei*	
Orden I: *Thermoproteales*	
Familia I: *Thermoproteaceae*	
Pyrobaculum	3 sp.
Sulfophobococcus	1 sp.
Thermocladium	1 sp.
Thermoproteus	2 sp.
Familia II: *Thermofilaceae*	
Thermofilum	1 sp.
Orden II: *Desulfurococcales*	
Familia I: *Desulfurococcaceae*	
Aeropyrum	1 sp.
Desulfurococcus	2 sp.
Igniococcus	1 sp.
Staphylothermus	1 sp.
Stetteria	1 sp.
Sulfophobococcus	1 sp.
Thermodiscus	1 sp.
Thermosphaera	1 sp.
Familia II: *Pyrodictiaceae*	
Hyperthermus	1 sp.
Pyrodictium	3 sp.
Pyrolobus	1 sp.
Orden II: *Sulfolobales*	
Familia I: *Sulfolobaceae*	
Acidianus	3 sp.
Metallosphaera	2 sp.
Stygiolobus	1 sp.
Sulfolobus	6 sp.
Sulfurisphaera	1 sp.
Sulfurococcus	2 sp.
SECCIÓN II Los metanógenos	
Phylum II *Euryarchaeota*	
Clase I: *Methanobacteria*	
Orden I: *Methanobacteriales*	
Familia I: *Methanobacteriaceae*	
Methanobacterium	19 sp.
Methanobrevibacter	7 sp.
Methanosphaera	2 sp.
Methanothermus	2 sp.
Clase II: *Methanococci*	
Orden I: *Methanococcales*	
Familia I: *Methanococcaceae*	
Methanococcus	11 sp.
Methanothermococcus	1 sp.
Familia II: *Methanocaldococcaceae*	
Methanocaldococcus	4 sp.
Methanotorris	1 sp.
Orden II: *Methanomicrobiales*	
Familia I: *Methanomicrobiaceae*	
Methanoculleus	6 sp.
Methanogenium	11 sp.
Methanolacinia	1 sp.
Methanomicrobium	2 sp.
Methanoplanus	3 sp.
Methanofollis	2 sp.
Familia II: *Methanocorpusculaceae*	
Methanocorpusculum	4 sp.
Orden III: Methanosarcinales	
Familia I: *Methanosarcinaceae*	
Methanococcoides	2 sp.
Methanohalobium	1 sp.
Methanohalophilus	5 sp.
Methanolobus	5 sp.
Methanosarcina	8 sp.
Methanosalsum	1 sp.
Familia II: Methanosaetaceae	
Methanosaeta	2 sp.
SECCIÓN III Los halobacterias	
Clase I: *Halobacteria*	
Orden I: *Halobacteriales*	
Familia I: *Halobacteriaceae*	
Haloarcula	10 sp.
Halobacterium	1 sp.
Halobaculum	1 sp.
Halococcus	3 sp.
Haloferax	4 sp.
Halogeometricum	1 sp.
Halorubrum	7 sp.
Haloterrigena	1 sp.
Natrialba	2 sp.
Natrinema	2 sp.
Natronobacterium	1 sp.
Natronococcus	2 sp.
Natronomonas	1 sp.
Natronorubrum	2 sp.
SECCIÓN IV Los termoplasmas	
Clase I: *'Thermoplasma'*	
Orden I: *Thermoplasmatales*	
Familia I: *Thermoplasmataceae*	
Thermoplasma	2 sp.
Familia II: *Picrophilaceae*	
Picrophilus	2 sp.
SECCIÓN V Los termococos	
Clase I: *Thermococci*	
Orden I: *Archaeoglobales*	
Familia I: *Archaeoglobaceae*	
Archaeoglobus	3 sp.
Ferroglobus	1 sp.
Orden II: *Thermococcales*	
Familia I: *Thermococcaceae*	
Pyrococcus	2 sp.
Thermococcus	12 sp.
Clase II: *Methanopyri*	
Orden I: *Methanopyrales*	
Familia I: *Methanopyraceae*	
Methanopyrus	1 sp.

THE DEEPLY BRANCHING GENERA OF *BACTERIA*

SECCIÓN VI *Aquifex* y géneros relacionados	
Clase I: *Aquificae*	
Orden I: *Aquificales*	
Familia I: *'Aquificaceae'*	
Aquifex	2 sp.
Calderobacterium	1 sp.
Hydrogenobacter	2 sp.
Thermocrinus	1 sp.
SECCIÓN VII Termotogas y geotogas	
Clase I: *Thermotogae*	

---

[*] Los géneros y taxones de orden superior incluidos en esta lista representan los organismos que se han reconocido hasta la fecha, en donde el número que aparece delante de cada nombre de género indica el número de especie reconocida hasta el año 2002. Los géneros o taxones de orden superior que aparecen entre comillas o en letra redonda en lugar de cursiva son taxonómicos reconocidos cuyos nombres no han obtenido aún la validación. No obstante, como la taxonomía bacteriana es un trabajo que se encuentra en continua evolución, la lista mostrada aquí se actualiza siempre que se describe una nueva especie o un nuevo género o cuando se obtienen datos que apoyen la realización o inclusión de nuevas distribuciones taxonómicas.

Orden I: *Thermotogales*	
Familia I: *Thermotogaceae*	
Fervidobacterium	4 sp.
Geotoga	2 sp.
Petrotoga	2 sp.
Thermosipho	2 sp.
Thermotoga	5 sp.
Clase II: *Thermodesulfobacteria*	
Orden I: *Thermodesulfobacteriales*	
Familia I: *Thermodesulfobacteriaceae*	
Thermodesulfobacterium	2 sp.
SECCIÓN VIII Los deinococos	
Clase I: *Deinococci*	
Orden I: *Deinococcales*	
Familia I: *Deinococcaceae*	
Deinococcus	8 sp.
SECCIÓN IX *Thermus* y géneros relacionados	
Clase I: *Thermi*	
Orden I: *Thermales*	
Familia I: *Thermaceae*	
Meiothermus	4 sp.
Thermus	6 sp.
SECCIÓN X Crisiógenos	
Clase I: *Chrysiogenetes*	
Orden I: *Chrysiogenales*	
Familia I: *Chrysiogenaceae*	
Chrysiogenes	1 sp.
SECCIÓN XI Los cloroflexos y herpetosifones	
Clase I: *'Chloroflexi'*	
Orden I: *'Chloroflexales'*	
Familia I: *'Chloroflexaceae'*	
Chloroflexus	2 sp.
Chloronema	1 sp.
Heliothrix	1 sp.
Oscillochloris	2 sp.
Orden II: *'Herpetosiphonales'*	
Familia I: *'Herpetosiphonaceae'*	
Herpetosiphon	5 sp.
SECCIÓN XII Termomicrobios	
Clase I: *'Thermomicrobia'*	
Orden I: *'Thermomicrobiales'*	
Familia I: *'Thermomicrobiaceae'*	
Thermomicrobium	2 sp.
SECCIÓN XIII *Nitrospira* y géneros relacionados	
Clase I: *'Nitrospira'*	
Orden I: *Nitrospirales*	
Familia I: *Nitrospiralaceae*	
Nitrospira	1 sp.
Thermodesulfovibrio	1 sp.
'Leptospirillum'	1 sp.
'Magnetobacterium'	1 sp.
SECCIÓN XIV *Deferribacter* y géneros relacionados	
Clase I: *Deferribacteraceae*	
Orden I: *Defferibacterales*	
Familia I: *Defferibacteraceae*	
Defferibacter	1 sp.
Flexistipes	1 sp.
Geovibrio	1 sp.
Synergistes	1 sp.
SECCIÓN XV Las *Cyanobacteria*	
Clase I: *'Prochlorophyta'*	
Orden I: *'Chroococcales'*	
Familia I:	
'Chamaesiphon'	2 sp.
'Chroococcus'	1 sp.
'Cyanobacterium'	1 sp.
'Cyanothece'	1 sp.
'Dactylococcopsis (Myxobaktron)'	1 sp.
'Gloeobacter'	1 sp.
'Gloeocapsa'	1 sp.
'Gloeothece'	1 sp.
'Microcystis'	0 sp.
'Prochlorococcus'	1 sp.
Prochloron	1 sp.
'Synechococcus'	3 sp.
'Synechocystis'	1 sp.
Orden II: 'Pleurocapsales'	
Familia I:	
'Chroococcidiopsis'	2 sp.
'Cyanocystis'	1 sp.
'Dermocarpa'	1 sp.
'Dermocarpella'	1 sp.
'Hyella'	1 sp.
'Myxosarcina'	1 sp.
'Pleurocapsa'	1 sp.
'Stanieria'	1 sp.
'Xenococcus'	1 sp.
Orden III: *'Oscillatoriales'*	
Familia I:	
'Arthrospira'	2 sp.
'Borzia'	1 sp.
'Crinalium'	1 sp.
'Geitlerinema'	1 sp.
'Hormoscilla'	1 sp.
'Isocystis'	1 sp.
'Leptolyngbia'	1 sp.
'Limnothrix'	1 sp.
'Lyngbya'	1 sp.
'Microcoleus'	2 sp.
'Oscillatoria'	6 sp.
'Planktothrix'	1 sp.
Prochlorothrix	1 sp.
'Pseudoanabaena'	1 sp.
'Spirulina'	1 sp.
'Starria'	1 sp.
'Symploca'	1 sp.
'Trichodesmium'	1 sp.
'Tychonema'	1 sp.
Orden IV: *'Nostocales'*	
Familia I: *'Nostocaceae'*	
'Anabaena'	1 sp.
'Anabaenopsis'	1 sp.
'Aphanizomenon'	1 sp.
'Cyanospira'	1 sp.
'Cylindrospermum'	2 sp.
'Microchaete'	1 sp.
'Nodularia'	1 sp.
'Nostoc'	4 sp.
Familia II: *'Scytonemataceae'*	
'Scytonema'	1 sp.
'Tolypothrix'	2 sp.
Familia III: *'Rivulariaceae'*	
'Calothrix'	1 sp.
'Rivularia'	1 sp.
Orden V: *'Stigonematales'*	
Familia IV:	
'Chlorogloeopsis'	1 sp.
'Fischerella'	1 sp.
'Geitleria'	1 sp.
'Hapalosiphon'	1 sp.
'Loriella'	1 sp.
'Mastigocladus'	1 sp.
'Mastigocoleus'	1 sp.
'Matteia'	1 sp.
'Nostochopsis'	1 sp.
'Stigonema'	1 sp.
SECCIÓN XVI	
Clorobios y otros fototrofos anoxigénicos verdes	
Clase I: *'Chlorobia'*	
Orden I: *Chlorobiales*	
Familia I: *Chlorobiaceae*	
Ancalochloris	1 sp.
Chlorobium	7 sp.
Chloroherpeton	1 sp.
Pelodictyon	4 sp.
Prosthecochloris	1 sp.

Clase II: *'Clostridia'*	
Orden I: *Clostridiales*	
Familia: *Heliobacteriaceae*	
Heliobacterium	3 sp.
Heliobacillus	1 sp.
Heliophilum	1 sp.
Heliorestis	1 sp.

VOLUMEN 2

Las proteobacterias

THE BACTERIA

Phylum VII: *'Proteobacteria'*	
SECCIÓN XVII Las α-Proteobacterias	
Clase I: *'Rhodospirilli'*	
Orden I: *Rhodospirillales*	
Familia I: *'Rhodospirillaceae'*	
Azospirillum	7 sp.
Magnetospirillum	2 sp.
Phaeospirillum	2 sp.
Rhodocista	1 sp.
Rhodospira	1 sp.
Rhodospirillum	9 sp.
Rhodothalassium	1 sp.
Rhodovibrio	2 sp.
Roseospira	1 sp.
Familia II: *Acetobacteraceae*	
Acetobacter	20 sp.
Acidiphilium	8 sp.
Acidocella	2 sp.
Acidomonas	1 sp.
Craurococcus	1 sp.
Frateuria	1 sp.
Gluconacetobacter	6 sp.
Gluconobacter	8 sp.
Paracraurococcus	1 sp.
Rhodopila	1 sp.
Roseococcus	1 sp.
Stella	2 sp.
Zavarzinia	1 sp.
Orden II: Rickettsiales	
Familia I: *Rickettsiaceae*	
Orientia	1 sp.
Rickettsia	22 sp.
Familia II: *Ehrlichiaceae*	
Aegyptianella	1 sp.
Anaplasma	4 sp.
Cowdria	1 sp.
Ehrlichia	8 sp.
Eperythrozoon	5 sp.
Haemobartonella	3 sp.
Neorickettsia	1 sp.
Familia III: *'Holosporaceae'*	
Caedibacter	5 sp.
Holospora	4 sp.
Lyticum	2 sp.
Polynucleobacter	1 sp.
Pseudocaedibacter	3 sp.
Symbiotes	1 sp.
Tectibacter	1 sp.
Orden III: *'Rhodobacterales'*	
Familia I: *'Rhodobacteraceae'*	
Amaricoccus	4 sp.
Antarctobacter	1 sp.
Gemmobacter	1 sp.
Hirschia	1 sp.
Hyphomonas	5 sp.
Octadecabacter	2 sp.
Paracoccus	13 sp.
Rhodobacter	8 sp.
Rhodovulum	4 sp.
Roseobacter	4 sp.
Sagittula	1 sp.
Sulfitobacter	1 sp.
Ahrensia	1 sp.
Roseovarius	1 sp.
Rubrimonas	1 sp.
Ruegeria	3 sp.
Stappia	2 sp.
Orden IV: *'Sphingomonadales'*	
Familia I: *'Sphingomonadaceae'*	
Blastomonas	1 sp.
Erythrobacter	2 sp.
Erythromicrobium	1 sp.
Erythromonas	1 sp.
Porphyrobacter	2 sp.
Rhizomonas	1 sp.
Sandaracinobacter	1 sp.
Sphingomonas	19 sp.
Zymomonas	2 sp.
Rhodanobacter	1 sp.
Orden V: *Caulobacterales*	
Familia I: *Caulobacteraceae*	
Asticcacaulis	2 sp.
Brevundimonas	2 sp.
Caulobacter	11 sp.
Orden VI: *'Rhizobiales'*	
Familia I: *Rhizobiaceae*	
Agrobacterium	10 sp.
Carbophilus	1 sp.
Chelatobacter	1 sp.
Ensifer	1 sp.
Rhizobium	20 sp.
Sinorhizobium	6 sp.
Familia II: *'Phyllobacteriaceae'*	
Mesorhizobium	7 sp.
Phyllobacterium	2 sp.
Familia III: *Bartonellaceae*	
Bartonella	14 sp.
Familia IV: *Brucellaceae*	
Brucella	6 sp.
Mycoplana	4 sp.
Ochrobactrum	2 sp.
Familia VI: *'Rhodobiaceae'*	
Rhodobium	2 sp.
Familia V: *Methylobacteriacea*	
Methylorhabdus	1 sp.
Protomonas	1 sp.
Roseomonas	3 sp.
Familia VI: *'Methylocystaceae'*	
Methylocystis	2 sp.
Methylosinus	2 sp.
Familia VII: *'Beijerinckiaceae'*	
Beijerinckia	6 sp.
Chelatococcus	1 sp.
Derxia	1 sp.
Familia VIII: *Hyphomicrobiaceae*	
Ancalomicrobium	1 sp.
Ancylobacter	1 sp.
Angulomicrobium	1 sp.
Aquabacter	1 sp.
Azorhizobium	1 sp.
Blastochloris	2 sp.
Devosia	1 sp.
Dichotomicrobium	1 sp.
Filomicrobium	1 sp.
Gemmiger	1 sp.
Hyphomicrobium	12 sp.
Labrys	1 sp.
Nevskia	1 sp.
Pedomicrobium	4 sp.
Prosthecomicrobium	4 sp.
Rhodomicrobium	1 sp.
Rhodoplanes	2 sp.
Seliberia	1 sp.

Xanthobacter	4 sp.
Familia IX: *'Bradyrhizobiaceae'*	
Afipia	3 sp.
Blastobacter	5 sp.
Bosea	1 sp.
Bradyrhizobium	3 sp.
Nitrobacter	1 sp.
Nitrococcus	1 sp.
Nitrospina	1 sp.
Oligotropha	1 sp.
Rhodopseudomonas	15 sp.
SECCIÓN XVIII Las β-Proteobacterias	
Clase I: *'Neisseriae'*	
Orden I: *'Neisseriales'*	
Familia I: *Neisseriaceae*	
Alysiella	1 sp.
Aquaspirillum	21 sp.
Catenococcus	1 sp.
Chromobacterium	2 sp.
Eikenella	1 sp.
Iodobacter	1 sp.
Kingella	4 sp.
Microvirgula	1 sp.
Neisseria	24 sp.
Prolinoborus	1 sp.
Simonsiella	3 sp.
Vogesella	1 sp.
Orden II: *'Burkholderiales'*	
Familia I: *'Burkholderiaceae'*	
Burkholderia	20 sp.
Cupriavidus	1 sp.
Ralstonia	3 sp.
Thermothrix	2 sp.
Familia II: *'Oxalobacteraceae'*	
Duganella	1 sp.
Janthinobacterium	1 sp.
Lautropia	1 sp.
Oxalobacter	2 sp.
Telluria	2 sp.
Familia III: *Alcaligenaceae*	
Achromobacter	4 sp.
Alcaligenes	16 sp.
Bordetella	7 sp.
Pelistega	1 sp.
Sutterella	1 sp.
Taylorella	1 sp.
Familia VI: *Comamonadaceae*	
Acidovorax	7 sp.
Brachymonas	1 sp.
Comamonas	3 sp.
Herbaspirillum	2 sp.
Hydrogenophaga	4 sp.
Ideonella	1 sp.
Leptothrix	5 sp.
Polaromonas	1 sp.
Rhodoferax	1 sp.
Rubrivivax	1 sp.
Sphaerotilus	1 sp.
Thiomonas	4 sp.
Variovorax	1 sp.
Orden III: *'Rhodocyclales'*	
Familia I: *'Rhodocyclaceae'*	
Azoarcus	5 sp.
Rhodocyclus	3 sp.
Thauera	4 sp.
Zoogloea	1 sp.
Orden IV: *'Nitrosomonadales'*	
Familia I: *'Nitrosomonadaceae'*	
Nitrosomonas	1 sp.
Nitrosospira	3 sp.
Familia II: *Spirillaceae*	
Spirillum	1 sp.
Thiobacillus	21 sp.
Familia III: *Gallionellacea*	
Gallionella	1 sp.
Orden V: 'Methylophilales'	
Familia I: *'Methylophilaceae'*	
Methylobacillus	2 sp.
Methylophaga	3 sp.
Methylophilus	1 sp.
Methylovorus	1 sp.
SECCIÓN XIX Las γ-Proteobacterias	
Clase I: *'Zymobacteria'*	
Orden I: *'Chromatiales'*	
Familia I: *Chromatiaceae*	
Allochromatium	3 sp.
Amoebobacter	4 sp.
Chromatium	13 sp.
Halochromatium	2 sp.
Isochromatium	1 sp.
Lamprobacter	1 sp.
Lamprocystis	1 sp.
Marichromatium	2 sp.
Nitrosococcus	2 sp.
Rhabdochromatium	1 sp.
Thermochromatium	1 sp.
Thiocapsa	5 sp.
Thiococcus	1 sp.
Thiocystis	4 sp.
Thiodictyon	2 sp.
Thiohalocapsa	1 sp.
Thiolamprovum	1 sp.
Thiopedia	1 sp.
Thiorhodococcus	1 sp.
Thiorhodovibrio	1 sp.
Thiospirillum	1 sp.
Familia II: *Ectothiorhodospiraceae*	
Arhodomonas	1 sp.
Ectothiorhodospira	9 sp.
Halorhodospira	3 sp.
Orden II: *'Xanthomonadales'*	
Familia I: *'Xanthomonadaceae'*	
Stenotrophomonas	2 sp.
Xanthomonas	24 sp.
Xylella	1 sp.
Orden III: *'Cardiobacteriales'*	
Familia I: *Cardiobacteriaceae*	
Cardiobacterium	1 sp.
Dichelobacter	1 sp.
Suttonella	1 sp.
Orden IV: *'Thiotrichales'*	
Familia I: *'Thiotrichaceae'*	
Achromatium	1 sp.
Beggiatoa	1 sp.
Leucothrix	1 sp.
Macromonas	2 sp.
Thiobacterium	1 sp.
Thioploca	4 sp.
Thiospira	1 sp.
Thiothrix	1 sp.
Vitreoscilla	3 sp.
Familia II: *Piscirickettsiaceae*	
Cycloclasticus	1 sp.
Hydrogenovibrio	1 sp.
Piscirickettsia	1 sp.
Thiomicrospira	4 sp.
Familia III: *'Francisellaceae'*	
Francisella	5 sp.
Orden V: *'Legionellales'*	
Familia I: *Legionellaceae*	
Legionella	44 sp.
Familia II: *'Coxiellaceae'*	
Coxiella	1 sp.
Rickettsiella	4 sp.
Orden VI: 'Methylococcales'	
Familia I: *Methylococcaceae*	

Methylobacter	6 sp.
Methylobacterium	9 sp.
Methylocaldum	3 sp.
Methylococcus	8 sp.
Methylomicrobium	3 sp.
Methylomonas	4 sp.
Methylosphaera	1 sp.
Orden VII: *'Oceanospirillales'*	
Familia I: *'Oceanospirillaceae'*	
Balneatrix	1 sp.
Marinomonas	2 sp.
Marinospirillum	2 sp.
Oceanospirillum	16 sp.
Familia II: *Halomonadaceae*	
Alcanivorax	1 sp.
Carnimonas	1 sp.
Chromohalobacter	1 sp.
Deleya	8 sp.
Halomonas	19 sp.
Zymobacter	1 sp.
Orden VIII: *Pseudomonadales*	
Familia I: *Pseudomonadaceae*	
Agromonas	1 sp.
Aminobacter	3 sp.
Azomonas	3 sp.
Azotobacter	19 sp.
Cellvibrio	2 sp.
Chryseomonas	2 sp.
Flavimonas	1 sp.
Lampropedia	1 sp.
Lysobacter	5 sp.
Mesophilobacter	1 sp.
Morococcus	1 sp.
Oligella	2 sp.
Phenylobacterium	1 sp.
Pseudomonas	117 sp.
Rhizobacter	1 sp.
Rugamonas	1 sp.
Serpens	1 sp.
Thermoleophilum	2 sp.
Xylophilus	1 sp.
Familia II: *Moraxellaceae*	
Acinetobacter	7 sp.
Moraxella	8 sp.
Moraxella (Branhamella)	4 sp.
Moraxella (Moraxella)	6 sp.
Psychrobacter	5 sp.
Orden IX: *'Alteromonadales'*	
Familia I: *'Alteromonadaceae'*	
Alteromonas	21 sp.
Colwellia	7 sp.
Ferrimonas	1 sp.
Marinobacter	1 sp.
Marinobacterium	1 sp.
Microbulbifer	1 sp.
Pseudoalteromonas	17 sp.
Shewanella	10 sp.
Orden X: *'Vibrionales'*	
Familia I: *Vibrionaceae*	
Allomonas	1 sp.
Enhydrobacter	1 sp.
Listonella	3 sp.
Photobacterium	10 sp.
Salinivibrio	1 sp.
Vibrio	46 sp.
Orden XI: *'Aeromonadales'*	
Familia I: *Aeromonadaceae*	
Aeromonas	23 sp.
Ruminobacter	1 sp.
Tolumonas	1 sp.
Orden XII: *'Enterobacteriales'*	
Familia I: *Enterobacteriaceae*	
Arsenophonus	1 sp.
Buchnera	1 sp.
Budvicia	1 sp.
Buttiauxella	7 sp.
Calymmatobacterium	1 sp.
Cedecea	3 sp.
Citrobacter	10 sp.
Edwardsiella	4 sp.
Enterobacter	15 sp.
Erwinia	30 sp.
Escherichia	6 sp.
Ewingella	1 sp.
Hafnia	1 sp.
Klebsiella	11 sp.
Kluyvera	4 sp.
Leclercia	1 sp.
Leminorella	2 sp.
Moellerella	1 sp.
Morganella	2 sp.
Obesumbacterium	1 sp.
Pantoea	8 sp.
Photorhabdus	1 sp.
Plesiomonas	1 sp.
Pragia	1 sp.
Proteus	7 sp.
Providencia	6 sp.
Rahnella	1 sp.
Saccharobacter	1 sp.
Salmonella	12 sp.
Serratia	12 sp.
Shigella	4 sp.
Tatumella	1 sp.
Trabulsiella	1 sp.
Wigglesworthia	1 sp.
Xenorhabdus	9 sp.
Yersinia	12 sp.
Yokenella	1 sp.
Brenneria	6 sp.
Pectobacterium	11 sp.
Sodalis	1 sp.
Orden XIII: *'Pasteurellales'*	
Familia I: *Pasteurellaceae*	
Actinobacillus	17 sp.
Haemophilus	20 sp.
Lonepinella	1 sp.
Pasteurella	23 sp.
Mannheimia	5 sp.
SECCIÓN XX Las δ-Proteobacterias	
Clase I: *'Predibacteria'*	
Orden I: *'Desulfovibrionales'*	
Familia I: *'Desulfovibrionaceae'*	
Bilophila	1 sp.
Desulfomicrobium	4 sp.
Desulfomonas	1 sp.
Desulfonatronovibrio	1 sp.
Desulfovibrio	29 sp.
Lawsonia	1 sp.
Familia II: *'Desulfurellaceae'*	
Desulfurella	4 sp.
Familia III: *'Desulfobacteraceae'*	
Desulfobacter	6 sp.
Desulfobacterium	7 sp.
Desulfococcus	2 sp.
Desulfosarcina	1 sp.
Desulfospira	1 sp.
Desulfocella	1 sp.
Familia IV: *'Desulfobulbaceae'*	
Desulfacinum	1 sp.
Desulfobulbus	3 sp.
Desulfocapsa	1 sp.
Desulfofustis	1 sp.
Desulfomonile	1 sp.
Desulforhabdus	1 sp.
Syntrophobacter	3 sp.

Thermodesulforhabdus	1 sp.
Familia V: *'Geobacteraceae'*	
Desulfohalobium	1 sp.
Desulfonema	2 sp.
Desulfuromonas	4 sp.
Desulfuromusa	3 sp.
Geobacter	2 sp.
Pelobacter	6 sp.
Familia VI: *'Bdellovibrionaceae'*	
Bdellovibrio	3 sp.
Micavibrio	1 sp.
Vampirovibrio	1 sp.
Orden II: *Myxococcales*	
Familia I: *Myxococcaceae*	
Angiococcus	1 sp.
Myxococcus	8 sp.
Familia II: *Archangiaceae*	
Archangium	1 sp.
Familia III: *Cystobacteraceae*	
Cystobacter	3 sp.
Melittangium	3 sp.
Stigmatella	2 sp.
Familia IV: *Polyangiaceae*	
Chondromyces	5 sp.
Nannocystis	1 sp.
Polyangium	10 sp.
SECCIÓN XXI Las *e*-Proteobacterias	
Clase I: *'Campylobacteres'*	
Orden I: *'Campylobacterales'*	
Familia I: *Campylobacteraceae*	
Arcobacter	4 sp.
Campylobacter	28 sp.
Sulfurospirillum	2 sp.
Thiovulum	1 sp.
Familia II: *'Helicobacteraceae'*	
Helicobacter	18 sp.
Wolinella	3 sp.

VOLUMEN 3

Bacteria Gram positivas con bajo G + C

LAS BACTERIAS

Phylum VIII: *'Firmicutes'*	
SECCIÓN XXII Las *Clostridia* y géneros relacionados	
Clase I: *'Clostridia'*	
Orden I: *Clostridiales*	
Familia I: *Clostridiaceae*	
Anaerobacter	1 sp.
Anaerofilum	2 sp.
Caloramator	3 sp.
Clostridium	146 sp.
Ilyobacter	3 sp.
Oxobacter	1 sp.
Sarcina	2 sp.
Sporobacter	1 sp.
Thermobrachium	1 sp.
Familia II: *'Peptostreptococcace'*	
Filifactor	1 sp.
Peptostreptococcus	18 sp.
Tissierella	3 sp.
Familia III: *'Eubacteriaceae'*	
Eubacterium	52 sp.
Helcococcus	1 sp.
Pseudoramibacter	1 sp.
Familia IV: *'Lachnospiraceae'*	
Acetitomaculum	1 sp.
Butyrivibrio	2 sp.
Catonella	1 sp.
Coprococcus	3 sp.
Johnsonella	1 sp.
Lachnospira	2 sp.
Pseudobutyrivibrio	1 sp.
Roseburia	1 sp.
Ruminococcus	14 sp.
Familia V: *Peptococcaceae*	
Acetonema	1 sp.
Acidaminococcus	1 sp.
Ammonifex	1 sp.
Desulfitobacterium	3 sp.
Desulfosporosinus	1 sp.
Desulfotomaculum	18 sp.
Dialister	1 sp.
Heliobacillus	1 sp.
Heliobacterium	3 sp.
Heliophilum	1 sp.
Megasphaera	2 sp.
Mitsuokella	2 sp.
Pectinatus	2 sp.
Peptococcus	8 sp.
Phascolarctobacterium	1 sp.
Propionispira	1 sp.
Quinella	1 sp.
Schwartzia	1 sp.
Selenomonas	11 sp.
Sporomusa	7 sp.
Succiniclasticum	1 sp.
Succinivibrio	1 sp.
Syntrophobotulus	1 sp.
Thermoterrabacterium	1 sp.
Veillonella	14 sp.
Zymophilus	2 sp.
Familia VI: *Syntrophomonadaceae*	
Acetogenium	1 sp.
Anaerobaculum	1 sp.
Anaerobranca	1 sp.
Caldicellulosiruptor	3 sp.
Dethiosulfovibrio	1 sp.
Moorella	3 sp.
Sporotomaculum	1 sp.
Syntrophomonas	3 sp.
Syntrophospora	1 sp.
Thermoanaerobacter	13 sp.
Thermoanaerobacterium	5 sp.
Thermoanaerobium	2 sp.
Thermohydrogenium	1 sp.
Thermosyntropha	1 sp.
Orden II: *Haloanaerobiales*	
Familia I: *Haloanaerobiaceae*	
Haloanaerobium	8 sp.
Halocella	1 sp.
Halothermothrix	1 sp.
Natroniella	1 sp.
Familia II: *Halobacteroidaceae*	
Acetohalobium	1 sp.
Haloanaerobacter	3 sp.
Halobacteroides	4 sp.
Orenia	1 sp.
Sporohalobacter	2 sp.
SECCIÓN XXIII Los molicutes	
Clase I: *Mollicutes*	
Orden I: *Mycoplasmatales*	
Familia I: *Mycoplasmataceae*	
Mycoplasma	110 sp.
Ureaplasma	6 sp.
Familia II: 'Spiroplasma group'	
Entomoplasma	6 sp.
Mesoplasma	12 sp.
Spiroplasma	33 sp.
Familia III: *Acholeplasmataceae*	
Acholeplasma	16 sp.
Anaeroplasma	4 sp.
Familia IV: *'Asteroleplasmataceae'*	
Asteroleplasma	1 sp.
Familia V: *'Erysipelothrichaeceae'*	

Erysipelothrix	2 sp.
Holdemania	1 sp.
SECCIÓN XXIV Los bacilos y lactobacilos	
Clase I: *'Bacilli'*	
Orden I: *Bacillales*	
Familia I: *Bacillaceae*	
Ammoniphilus	2 sp.
Aneurinibacillus	3 sp.
Bacillus	114 sp.
Brevibacillus	10 sp.
Exiguobacterium	2 sp.
Halobacillus	3 sp.
Oxalophagus	1 sp.
Saccharococcus	1 sp.
Virgibacillus	1 sp.
Familia II: *Planococcaceae*	
Filibacter	1 sp.
Kurthia	3 sp.
Planococcus	5 sp.
Sporosarcina	2 sp.
Familia III: *Caryophanaceae*	
Caryophanon	2 sp.
Familia IV: *'Sporolactobacillaceae'*	
Marinococcus	3 sp.
Sporolactobacillus	6 sp.
Familia V: *'Paenibacillaceae'*	
Paenibacillus	27 sp.
Familia VI: *'Alicyclobacillaceae'*	
Alicyclobacillus	3 sp.
Sulfobacillus	3 sp.
Familia VII: *'Thermoactinomycetaceae'*	
Thermoactinomyces	8 sp.
Orden II: *'Lactobacillales'*	
Familia I: *Lactobacillaceae*	
Lactobacillus	100 sp.
Familia II: *'Leuconostocaceae'*	
Leuconostoc	15 sp.
Oenococcus	1 sp.
Weissella	7 sp.
Familia III: *Streptococcaceae*	
Lactococcus	7 sp.
Pediococcus	8 sp.
Streptococcus	68 sp.
Familia IV: *'Enterococcaceae'*	
Enterococcus	20 sp.
Melissococcus	1 sp.
Vagococcus	2 sp.
Familia V: *'Carnobacteriaceae'*	
Agitococcus	1 sp.
Alloiococcus	1 sp.
Carnobacterium	6 sp.
Dolosigranulum	1 sp.
Lactosphaera	1 sp.
Desemzia	1 sp.
Familia VI: *'Aerococcaceae'*	
Abiotrophia	3 sp.
Aerococcus	2 sp.
Facklamia	2 sp.
Globicatella	1 sp.
Tetragenococcus	2 sp.
Ignavigranum	1 sp.
Familia VII: *'Listeriaceae'*	
Brochothrix	2 sp.
Listeria	9 sp.
Familia VIII: *'Staphylococcaceae'*	
Gemella	4 sp.
Macrococcus	4 sp.
Salinicoccus	2 sp.
Staphylococcus	47 sp.
Familia IX: 'Géneros de posición incierta'	
Acetoahaerobium	1 sp.
Acetobacterium	7 sp.
Amphibacillus	1 sp.
Oscillospira	1 sp.
Pasteuria	4 sp.
Syntrophococcus	1 sp.
Trichococcus	1 sp.

VOLUMEN 4

Bacteria Gram positivas con alto G + C

LAS BACTERIAS

Phylum VIII: *'Firmicutes'*	
SECCIÓN XXV Las actinobacterias	
Clase I: *Actinobacteria*	
Subclase I: *Acidimicrobidae*	
Orden I: *Acidimicrobiales*	
Suborden I: *Acidimicrobidae*	
Familia I: *Acidimicrobiaceae*	
Acidimicrobium	1 sp.
Subclase II: *Rubrobacteridae*	
Orden II: *Rubrobacterales*	
Suborden I: *Rubrobacteridae*	
Familia I: *Rubrobacteraceae*	
Rubrobacter	2 sp.
Subclase III: *Coriobacteridae*	
Orden III: *Coriobacteriales*	
Suborden I: *Coriobacteridae*	
Familia I: *Coriobacteriaceae*	
Atopobium	3 sp.
Coriobacterium	1 sp.
Subclase IV: *Sphaerobacteridae*	
Orden IV: *'Sphaerobacterales'*	
Suborden I: *Sphaerobacteridae*	
Familia I: *Sphaerobacteraceae*	
Sphaerobacter	1 sp.
Subclase V: *Actinobacteridae*	
Orden V: *Actinomycetales*	
Suborden I: *Actinomycineae*	
Familia I: *Actinomycetaceae*	
Actinobaculum	2 sp.
Actinomyces	23 sp.
Arcanobacterium	4 sp.
Mobiluncus	3 sp.
Suborden II: *Micrococcineae*	
Familia II: *Micrococcaceae*	
Arthrobacter	32 sp.
Bogoriella	1 sp.
Demetria	1 sp.
Kocuria	6 sp.
Leucobacter	1 sp.
Micrococcus	9 sp.
Nesterenkonia	1 sp.
Renibacterium	1 sp.
Rothia	1 sp.
Stomatococcus	1 sp.
Terracoccus	1 sp.
Familia III: *'Brevibacteraceae'*	
Brevibacterium	26 sp.
Familia IV: *Cellulomonadaceae*	
Cellulomonas	11 sp.
Oerskovia	2 sp.
Rarobacter	2 sp.
Familia V: *Dermabacteraceae*	
Brachybacterium	7 sp.
Dermabacter	1 sp.
Familia VI: *Dermatophilaceae*	
Dermacoccus	1 sp.
Dermatophilus	2 sp.
Kytococcus	1 sp.
Familia VII: *Intrasporangiaceae*	
Intrasporangium	1 sp.
Janibacter	1 sp.
Sanguibacter	3 sp.

Terrabacter	1 sp.
Familia VIII: *Jonesiaceae*	
Jonesia	1 sp.
Familia IX: *Microbacteriaceae*	
Agrococcus	1 sp.
Agromyces	6 sp.
Aureobacterium	14 sp.
Clavibacter	11 sp.
Cryobacterium	1 sp.
Curtobacterium	8 sp.
Microbacterium	27 sp.
Rathayibacter	4 sp.
Familia X: *Promicromonosporaceae*	
Promicromonospora	3 sp.
Suborden III: *Corynebacterineae*	
Familia I: *Corynebacteriaceae*	
Corynebacterium	67 sp.
Familia II: *Dietziaceae*	
Dietzia	2 sp.
Familia III: *Gordoniaceae*	
Gordonia	9 sp.
Skermania	1 sp.
Familia IV: *Mycobacteriaceae*	
Mycobacterium	85 sp.
Familia V: *Nocardiaceae*	
Micropolyspora	5 sp.
Nocardia	29 sp.
Rhodococcus	25 sp.
Familia VI: *Tsukamurellaceae*	
Tsukamurella	5 sp.
Suborden IV: *Micromonosporaceae*	
Familia I: *Micromonosporaceae*	
Actinoplanes	23 sp.
Catellatospora	5 sp.
Catenuloplanes	6 sp.
Couchioplanes	2 sp.
Dactylosporangium	6 sp.
Micromonospora	19 sp.
Pilimelia	4 sp.
Spirilliplanes	1 sp.
Verrucosispora	1 sp.
Suborden VI: *Propionibacterineae*	
Familia I: *Propionibacteriaceae*	
Luteococcus	1 sp.
Microlunatus	1 sp.
Propionibacterium	12 sp.
Propioniferax	1 sp.
Familia II: *Nocardioidaceae*	
Aeromicrobium	2 sp.
Friedmanniella	1 sp.
Nocardioides	7 sp.
Suborden VII: *Pseudonocardineae*	
Familia I: *Pseudonocardiaceae*	
Actinopolyspora	3 sp.
Actinosynnema	3 sp.
Amycolatopsis	11 sp.
Kibdelosporangium	4 sp.
Kutzneria	3 sp.
Lentzea	1 sp.
Micropolyspora	5 sp.
Pseudonocardia	12 sp.
Saccharomonospora	5 sp.
Saccharopolyspora	10 sp.
Saccharothrix	15 sp.
Streptoalloteichus	1 sp.
Thermobispora	1 sp.
Thermocrispum	2 sp.
Suborden VIII: *Streptomycineae*	
Familia I: *Streptomycetaceae*	
Streptomyces	509 sp.
Suborden IX: *Streptosporangineae*	
Familia I: *Streptosporangiaceae*	
Herbidospora	1 sp.
Microbispora	15 sp.
Micropolyspora	5 sp.
Microtetraspora	20 sp.
Nonomuria	15 sp.
Planobispora	2 sp.
Planomonospora	5 sp.
Planopolyspora	1 sp.
Planotetraspora	1 sp.
Streptosporangium	19 sp.
Familia II: *Nocardiopsaceae*	
Nocardiopsis	17 sp.
Thermobifida	2 sp.
Familia III: *Thermomonosporaceae*	
Actinomadura	51 sp.
Spirillospora	2 sp.
Thermomonospora	7 sp.
Suborden X: *Frankineae*	
Familia I: *Frankiaceae*	
Frankia	1 sp.
Familia II: *Geodermatophilaceae*	
Blastococcus	1 sp.
Geodermatophilus	1 sp.
Familia III: *Microsphaeraceae*	
Microsphaera	1 sp.
Familia IV: *Sporichthyaceae*	
Sporichthya	1 sp.
Familia V: *Acidothermaceae*	
Acidothermus	1 sp.
Familia VI: 'Posición incierta'	
Cryptosporangium	2 sp.
Kineococcus	1 sp.
Kineosporia	5 sp.
Suborden XI: *Glycomycineae*	
Familia I: *Glycomycetaceae*	
Glycomyces	3 sp.
Orden VI: *Bifidobacteriales*	
Familia I: *Bifidobacteriaceae*	
Bifidobacterium	33 sp.
Falcivibrio	2 sp.
Gardnerella	1 sp.
Familia II: 'Afilación desconocida'	
Actinobispora	1 sp.
Actinocorallia	1 sp.
Actinokineospora	5 sp.
Excellospora	1 sp.
Pelczaria	1 sp.
Turicella	1 sp.

VOLUMEN 5

Los planctomicetos, los espiroquetes, las fibrobacterias, los bacteroides y las flavobacterias

LAS BACTERIAS

Phylum IX: 'Formas sin pared'	
SECCIÓN XXVI Los planctomicetos y clamidias	
Clase I: *'Planctomycetacia'*	
Orden I: *Planctomycetales*	
Familia I: *Planctomycetaceae*	
Gemmata	1 sp.
Isosphaera	1 sp.
Pirellula	2 sp.
Planctomyces	6 sp.
Orden II: *Chlamydiales*	
Familia I: *Chlamydiaceae*	
Chlamydia	4 sp.
SECCIÓN XXVII Los espiroquetes	
Phylum X: *'Spirochetes'*	
Clase I: *'Spirochaetes'*	
Orden I: *'Spirochaetales'*	
Familia I: *Spirochaetaceae*	
Borrelia	30 sp.

Brevinema	1 sp.
Clevelandina	1 sp.
Cristispira	1 sp.
Diplocalyx	1 sp.
Hollandina	1 sp.
Pillotina	1 sp.
Spirochaeta	14 sp.
Treponema	18 sp.
Familia II: *Serpulinaceae*	
Brachyspira	5 sp.
Serpulina	6 sp.
Familia III: *Leptospiraceae*	
Leptonema	1 sp.
Leptospira	12 sp.
SECCIÓN XXVIII Las fibrobacterias	
Phylum XI: '*Fibrobacter*'	
Clase I: '*Fibrobacteres*'	
Orden I: '*Fibrobacterales*'	
Familia I: '*Fibrobacteraceae*'	
Fibrobacter	3 sp.
Familia II: '*Acidobacteriaceae*'	
Acidobacterium	1 sp.
Holophaga	1 sp.
SECCIÓN XXIX Los bacteroides	
Phylum XII: '*Bacteroids*'	
Clase I: '*Bacteroides*'	
Orden I: '*Bacteroidales*'	
Familia I: *Bacteroidaceae*	
Acetivibrio	4 sp.
Acetofilamentum	1 sp.
Acetomicrobium	2 sp.
Acetothermus	1 sp.
Acidaminobacter	1 sp.
Anaerobiospirillum	2 sp.
Anaerorhabdus	1 sp.
Anaerovibrio	3 sp.
Bacteroides	65 sp.
Centipeda	1 sp.
Formivibrio	1 sp.
Malonomonas	1 sp.
Megamonas	1 sp.
Propionivibrio	1 sp.
Succinimonas	1 sp.
Syntrophus	2 sp.
Familia II: '*Rikenellaceae*'	
Marinilabilia	2 sp.
Rikenella	1 sp.
Familia III: '*Porphyromonadaceae*'	
Porphyromonas	13 sp.
Familia IV: *Prevotellaceae*	
Prevotella	26 sp.
SECCIÓN XXX Las flavobacterias	
Phylum XIII: '*Flavobacteria*'	
Clase I: '*Flavobacteria*'	
Orden I: '*Flavobacteriales*'	
Familia I: *Flavobacteriaceae*	
Bergeyella	1 sp.
Capnocytophaga	7 sp.
Chryseobacterium	6 sp.
Empedobacter	1 sp.
Flavobacterium	40 sp.
Gelidibacter	1 sp.
Ornithobacterium	1 sp.
Polaribacter	4 sp.
Psychroserpens	1 sp.
Riemerella	2 sp.
Weeksella	2 sp.
Psychroflexus	2 sp.
Familia II: '*Myroideaceae*'	
Myroides	2 sp.
Psychromonas	1 sp.
Familia III: '*Blattabacteriaceae*'	
Blattabacterium	1 sp.
SECCIÓN XXXI Las esfingobacterias	
Phylum XIV: '*Sphingobacteria*'	
Clase I: '*Sphingobacteria*'	
Orden I: '*Sphingobacteriales*'	
Familia I: *Sphingobacteriaceae*	
Pedobacter	4 sp.
Sphingobacterium	8 sp.
Familia II: '*Saprospiraceae*'	
Haliscomenobacter	1 sp.
Lewinella	3 sp.
Saprospira	1 sp.
Familia III: '*Flexibacteraceae*'	
Cyclobacterium	1 sp.
Cytophaga	23 sp.
Flectobacillus	3 sp.
Flexibacter	17 sp.
Meniscus	1 sp.
Microscilla	1 sp.
Runella	1 sp.
Spirosoma	1 sp.
Sporocytophaga	1 sp.
Familia IV: '*Flammeovirgaceae*'	
Flammeovirga	1 sp.
Persicobacter	1 sp.
Thermonema	2 sp.
Familia V: '*Crenothrichaeceae*'	
Chitinophaga	1 sp.
Crenothrix	1 sp.
Flexithrix	1 sp.
Rhodothermus	2 sp.
Toxothrix	1 sp.
SECCIÓN XXXII Los fusiformes	
Phylum XV: '*Fusobacteria*'	
Clase I: '*Fusobacteria*'	
Orden I: '*Fusobacteriales*'	
Familia I: '*Fusobacteriaceae*'	
Fusobacterium	23 sp.
Leptotrichia	1 sp.
Propionigenium	2 sp.
Sebaldella	1 sp.
Streptobacillus	1 sp.
Familia II: 'Géneros de posición incierta'	
Cetobacterium	1 sp.
SECCIÓN XXXIII Género verrucomicrobium y géneros relacionados	
Phylum XVI: '*Verrucomicrobia*'	
Clase I: *Verrucomicrobiae*	
Orden I: *Verrucomicrobiales*	
Familia I: *Verrucomicrobiaceae*	
Prosthecobacter	4 sp.
Verrucomicrobium	1 sp.

Glosario

Aceptor de electrones Una sustancia que puede aceptar electrones de otra sustancia y que se reduce durante el proceso.

Acetogénesis (homoacetogénesis) Metabolismo energético con producción de acetato, bien a partir de H_2 más CO_2, bien a partir de compuestos orgánicos.

Acetotrófico Consumidor de acetato. Se usa para describir un metanógeno, organismo capaz de escindir la molécula de acetato en CH_4 y CO_2.

Ácido alcohol resistencia Una propiedad de las especies del género Mycobacterium donde las células teñidas con el colorante básico fuchsina, resisten la decoloración con alcohol acidificado.

Ácido nucleico de cadena más (positiva) Una cadena de RNA o DNA que tiene el mismo sentido que el mRNA de un virus.

Ácido nucleico de cadena menos (negativa) Una cadena de RNA o DNA que tiene el sentido opuesto (es decir, que es complementaria) del mRNA de un virus.

Acidófilo Un organismo que crece mejor a pH bajo.

Actividad de agua (a_w) Disponibilidad de agua para su uso en procesos metabólicos.

Aeróbico Metabolismo, célula u organismo que funciona con oxígeno (se aplica principalmente en relación con un ser vivo). (*Véase* óxico).

Aerobio Un organismo que puede usar el O_2 en la respiración; algunos requieren O_2 para el crecimiento.

Agente antimicrobiano Un compuesto químico que mata o inhibe el crecimiento de los microorganismos.

Agente bactericida Un agente que mata las bacterias.

Agente bacteriostático Agente que inhibe el crecimiento bacteriano.

Agente fungicida Un agente que mata hongos.

Agente fungistático Un agente que inhibe el crecimiento de los hongos.

Agente quimioterapéutico Un agente antimicrobiano que puede usarse por vía interna.

Agente virucida Un agente que detiene la replicación vírica y la actividad.

Agente virustático Un agente que inhibe la replicación vírica.

Aglutinación Reacción entre un anticuerpo y un antígeno unido a una partícula, que da lugar a un agregado de partículas visible.

Agretopo Porción del antígeno procesado reconocido por el MHC.

Aguda Infección de corta duración que se establece rápidamente y tiene una rápida recuperación.

Agua en estado natural Agua superficial o subterránea que no ha sido tratada para su consumo (también llamada «agua sin tratar»).

Agua residual Líquidos contaminados con material fecal humano o animal.

Agua sin tratar Agua superficial o subterránea que no ha sido tratada para su consumo (también llamada «agua en estado natural»).

Agua tratada Agua que se distribuye después de su tratamiento.

Aguas contaminadas Agua derivada del consumo humano o industrial que no puede ser vertida a un río o lago sin ser tratada adecuadamente.

Alcalófilo Un organismo que crece mejor a pH alto.

Algas Microorganismos eucarióticos fototrópicos.

Alimentos alterados Cambio en las características organolépticas: apariencia, olor, o sabor, de un alimento que le hace inaceptable para su consumo.

Alimentos no perecederos (estables) Alimentos con escasa actividad de agua que disponen de un largo periodo de conservación y son resistentes a la alteración por microorganismos.

Alimentos perecederos Alimentos frescos generalmente con alta actividad de agua, que disponen de periodos de conservación muy cortos debido a una potencial alteración por el crecimiento de microorganismos.

Alimentos semiperecederos Alimentos de intermedia actividad de agua que disponen de un tiempo de conservación limitado debido a la potencial alteración por el crecimiento de microorganismos.

Aminoacil-tRNA sintetasas Un grupo de enzimas cada una de las cuales cataliza la unión del aminoácido correcto a un tRNA.

Aminoglicósidos Un grupo de antibióticos tales como la estreptomicina, que contienen aminoazúcares unidos por enlaces glicosídicos.

Anabolismo La suma total de todas las reacciones biosintéticas de la célula.

Anaeróbico Metabolismo, célula u organismo que funciona sin la intervención del oxígeno (se aplica principalmente en relación con un ser vivo.) (*Véase* anóxico).

Anaerobio Un organismo que no puede usar el O_2 en la respiración y cuyo crecimiento puede ser inhibido por el O_2.

Anaerobio aerotolerante Un microorganismo incapaz de respirar con oxígeno molecular (O_2) pero que no es afectado por la presencia de O_2.

Análogo de un factor del crecimiento Un agente químico que es análogo de un factor de crecimiento y bloquea su incorporación.

Anamox Oxidación anóxica de amoníaco.

Anemia falciforme Condición genética que confiere resistencia a la malaria pero que causa una reducción en la eficiencia de los glóbulos rojos para captar oxígeno.

Anergia Incapacidad de producir una respuesta frente a antígenos específicos debido a la neutralización de las células efectoras.

Anóxico Sin oxígeno (se aplica principalmente a un medio de cultivo, hábitat o ambiente).

Antena Referido a los fotocomplejos y moléculas de pigmento captadoras de luz que envían energía a los centros de reacción.

Antibiograma Revisión de la sensibilidad de los antibióticos en uso de aislados clínicos.

Antibiótico Sustancia química producida por un microorganismo que mata o inhibe el crecimiento de otro microorganismo.

Antibiótico de amplio espectro Un antibiótico que actúa tanto sobre microorganismos Gram positivos como sobre Gram negativos del dominio *Bacteria*.

Antibióticos α-lactámicos Un grupo de antibióticos tales como la penicilina, que contienen el anillo α-lactámico de cuatro átomos heterocíclico.

Antibióticos β-lactámicos Un grupo de antibióticos, entre los que se incluye la penicilina, que contiene el anillo β-lactámico heterocíclico de cuatro átomos.

Anticodón Una secuencia de tres bases en una molécula de tRNA que aparea con un codón durante la síntesis de proteínas.

Anticuerpo Proteína soluble, producida por los linfocitos B, que interacciona con el antígeno; también se le conoce como inmunoglobulina.

Anticuerpo fluorescente Modificación covalente de una molécula de anticuerpo con un colorante fluorescente, de tal manera que el colorante hace visible el anticuerpo bajo la luz fluorescente.

Anticuerpo monoclonal Anticuerpo hecho por una sola célula B.

Anticuerpo policlonal Anticuerpo hecho por muchas células B.

Antígeno Una molécula capaz de interaccionar con los componentes específicos del sistema inmunitario.

Antiparalelo En relación al DNA bicatenario, una cadena va en la dirección $5' \rightarrow 3'$ y la otra en la dirección $3' \rightarrow 5'$.

Antiséptico Agentes antimicrobianos que son suficientemente poco tóxicos como para ser aplicados a los tejidos vivos.

Apolar Que posee características hidrofóbicas (repulsión al agua) y se disuelve difícilmente en agua.

Apoptosis Programmed cell death.

Árbol universal Un árbol filogenético que muestra la posición de los representantes de todos los dominios de organismos vivos.

Archaea Un grupo de procariotas relacionados filogenéticamente y distinto de *Bacteria*.

Arqueas Procariotas relacionados filogenéticamente, pertenecientes al dominio *Archaea* y distintos del dominio *Bacteria*.

Atenuación Un mecanismo que controla la expresión génica; la transcripción se termina después de la iniciación pero antes de que se produzca un mRNA completo.

ATP sintetasa (ATPasa) Complejo enzimático multiproteico anclado en la membrana que cataliza la síntesis de ATP acoplada a la fuerza motriz de protones.

Autoanticuerpo Un anticuerpo dirigido contra antígenos propios.

Autoclave Un esterilizador que destruye los microorganismos con temperatura y vapor de agua bajo presión.

Autolisis Lisis celular espontánea, normalmente debida a la actividad de proteínas líticas llamadas autolisinas.

Autotrofia Utilización de CO_2 como única fuente de carbono.

Autótrofo Un organismo capaz de biosintetizar todo el material celular a partir del CO_2 como única fuente de carbono.

Auxotrofo Un organismo que ha desarrollado un requerimiento nutricional mediante mutación.

Bacteria Un grupo de procariotas filogenéticamente relacionados y distinto de *Archaea*.

Bacterias entéricas Un gran grupo de bacilos Gram negativos y metabolismo anaerobio facultativo.

Bacterias nitrificantes Quimiolitotrofos capaces de llevar a cabo la transformación $NH_3 \rightarrow NO_2$ o $NO_2 \rightarrow NO_3$.

Bacterias reductoras de sulfato Un gran grupo de bacterias anaerobias que respiran anaeróbicamente utilizando SO_4^{2-} como aceptor de electrones produciendo H_2S.

Bacterias rojas del azufre Un grupo de procariotas fototrópico que contienen bacterioclorofila *a* o *b*, que se caracterizan por su capacidad de oxidar H_2S y por acumular azufre elemental en el interior celular (excepto en el género *Ectothiorhodospira* que lo hace en el exterior).

Bacterias rojas no del azufre Un grupo de procariotas fototrópicos que contienen bacterioclorofila *a* o *b* que crecen mejor como fotoheterotrofos y tienen relativamente baja tolerancia a H_2S.

Bacterias verdes Procariotas fototróficos anoxigénicos que contienen clorosomas y bacterioclorofilas *c*, *d* o *e*.

Bacteriemia Presencia de bacterias en la sangre.

Bacterioclorofila Pigmento clorofílico de los fototrofos anoxigénicos.

Bacteriófago Un virus que infecta células procarióticas.

Bacteriorrodopsina Proteína de membrana que contiene retinal, producida por ciertos halófilos extremos y capaz de generar una fuerza motriz de protones mediante energía lumínica.

Bacteroide Células deformes de *Rhizobium* en el interior de un nódulo radical de leguminosa; puede fijar N_2.

Banda más (positiva) Una banda de RNA o DNA que tiene el mismo sentido que el mRNA del virus.

Banda menos (negativa) Del ácido nucleico una banda de RNA o DNA que tiene sentido opuesto al (es complementaria de) mRNA del virus.

Barófilo Organismo que crece mejor a presiones elevadas superiores a 1 atm.

Barotolerante Organismo que puede crecer a presiones elevadas, pero que crece mejor a presión atmosférica.

Bebida destilada Una bebida que contiene alcohol concentrado por destilación.

Biocatálisis La utilización de microorganismos en una transformación química específica.

Bioconversión La utilización de microorganismos para realizar una reacción química que es más cara o irrealizable no biológicamente.

Biofilme Colonias de células microbianas recubiertas o incluidas en sustancias mucosas y adheridas a una superficie.

Biogeoquímica Estudio de las transformaciones químicas realizadas por organismos en el ambiente.

Bioinformática Uso de computadoras para analizar, guardar y acceder a secuencias de DNA y proteínas.

Biota normal (microbiota) Microorganismos que están presentes generalmente en los tejidos sanos.

Biotecnología Uso de organismos vivos para llevar a cabo procesos químicos concretos destinados a la aplicación industrial.

Botulismo Intoxicación alimentaria debida a la ingestión de alimentos que contienen la toxina botulínica producida por *Clostridium botulinum*.

Brote Aparición de un gran número de casos de una enfermedad en un corto periodo de tiempo.

Cambios antigénicos Grandes cambios en los antígenos debidos a reagrupamientos génicos en el virus de la gripe.

Capa Viscosa (*Slime layer*) Fibras difusas que rodean la célula y que se extienden fuera de ella.

Cápsula Bien definida y densa capa de polisacárido o proteína que rodea a la célula.

Carboxisomas Inclusiones celulares cristalinas y poliédricas de ribulosa difosfato carboxilasa (RubisCO), enzima clave del ciclo de Calvin.

Carga vírica Valoración cuantitativa de la cantidad de virus que hay en un organismo.

Caries dental Deterioro dental como resultado de una infección bacteriana.

Carotenoides Pigmentos hidrofóbicos accesorios presentes en las membranas fotosintéticas junto con la clorofila.

Catabolismo Conjunto de reacciones bioquímicas que conducen a la producción de energía utilizable por la célula (normalmente ATP).

Catalizador Una sustancia que acelera una reacción química pero que no se consume en la reacción.

Célula Unidad fundamental de la materia viva.

Célula asesina natural (NK, del inglés natural killer) Un leucocito especializado que reconoce y destruye células extrañas o células infectadas del hospedador, sin que exista un reconocimiento específico del antígeno.

Célula B Un linfocito que produce inmunoglobulinas.

Célula presentadora de antígeno (APC) Cualquier célula cuya función esencial sea presentar antígeno a la célula T.

Célula T Linfocito responsable de las respuestas celulares específicas de antígeno. Los linfocitos T se subdividen en T citotóxicos (T_C) y T cooperadores (T_H). Los cooperadores se subdividen en T_H1 (células proinflamatorias) y T_H2, que ayudan a producir anticuerpos.

Centro de reacción Complejo fotosintético que contiene clorofila (o bacterioclorofila) y otros componentes, dentro del cual se producen las reacciones iniciales de transferencia de electrones en la fotosíntesis.

Cerveceo («brewing») Elaboración de bebidas alcohólicas tales como la cerveza a partir de la fermentación de cereales malteados.

Cianobacteria Procariotas fotosintéticos oxigénicos que contienen clorofila *a* y ficobilinas pero no clorofila *b*.

Ciclo de Calvin Vía bioquímica de fijación de CO_2 en muchos organismos autotrofos.

Ciclo del ácido cítrico Un ciclo de reacciones que dan como resultado la conversión del acetato en dos moléculas de CO_2.

Ciclo lisogénico Una serie de etapas que, tras la infección del virus, conducen a un estado (lisogenia) en el que el genoma vírico se replica como un profago junto con el genoma del hospedador.

Ciclo lítico Una serie de etapas tras la infección del virus que conduce a la replicación vírica y destrucción (lisis) de la célula hospedadora.

Ciliados Un grupo de protozoos que se caracterizan por su rápido movimiento producido por los cilios: apéndices cortos y numerosos.

Cirrosis Destrucción de la arquitectura normal del hígado dando una fibrosis.

Citocina Modulador soluble de la respuesta inmune producido por leucocitos.

Citoesqueleto Entramado de microfibrillas típico de las células eucarióticas que determina la forma celular.

Citoplasma Porción fluida de una célula limitada por la membrana celular exceptuando el núcleo (si existe).

Citoquina Proteína pequeña, soluble, producida por un linfocito y encargada de modular las reacciones inflamatorias y la inmunidad a través de sus efectos en las células diana.

Clarificador (depósito de coagulación) Reservorio en el cual los sólidos en suspensión del agua son coagulados y eliminados.

Clonación molecular Aislamiento e incorporación de un fragmento de DNA dentro de un vector en el que puede replicarse.

Clonación por shot-gun Fabricación de una genoteca utilizando fragmentos de DNA obtenidos al azar.

Cloramina Sustancia química producida *«in situ»* por la combinación de cloro y amoniaco en una proporción determinada.

Cloro Sustancia química que en su estado gaseoso se emplea para desinfectar el agua. Un cierto nivel residual se mantiene en el sistema de distribución.

Clorofila Porfirina con Mg de los organismos fotosintéticos, sensible a la luz, que inicia el proceso de fotofosforilación.

Cloroplasto El orgánulo fotosintético de eucariotas fototróficos.

Clorosomas Estructuras en forma de cigarro rodeados por membrana atípica y que contienen los pigmentos fotosintéticos bacterioclorofilas *c*, *d* o *e* en bacterias verdes y *Chloroflexus*.

CMI Concentración mínima inhibitoria; la concentración mínima de una sustancia necesaria para impedir el crecimiento microbiano.

Coagulación Formación de grandes partículas insolubles a partir de partículas coloidales mucho menores, mediante adición de sulfato de aluminio y polímeros aniónicos.

Codón Una secuencia de tres bases en el mRNA que codifica un aminoácido.

Coenzima Una pequeña molécula no proteica que participa en una reacción catalítica como parte de una enzima.

Coliformes Bacterias Gram negativas, no esporuladas, fermentadoras de lactosa, y aeróbicas o anaeróbicas facultativas.

Colonización Multiplicación de un patógeno tras alcanzar los tejidos del hospedador.

Columna de Winogradsky Una columna compactada con lodo y cubierta con agua para imitar un lago, donde diversas bacterias se desarrollan en un periodo de meses.

Cometabolismo Metabolismo de un compuesto en presencia de un segundo compuesto orgánico, que es usado como fuente primaria de energía.

Complejo principal de histocompatibilidad (MHC) Un complejo génico que codifica diversas proteínas de superficie importantes en la presentación del antígeno a las células T.

Complemento Conjunto de proteínas que reaccionan secuencialmente con complejos antígeno-anticuerpo para amplificar o potenciar su actividad.

Conidios Esporas asexuales de los hongos.

Conjugación Transferencia de genes de una célula procariótica a otra por un mecanismo que implica contacto célula-célula y un plásmido.

Consorcios Asociación de dos o más procariotas viviendo en simbiosis íntima.

Control negativo Un mecanismo que regula la expresión génica en el cual una proteína represora funciona previniendo la transcripción de uno o más genes.

Control positivo Un mecanismo que regula la expresión génica en el que una proteína activadora funciona promoviendo la transcripción de uno o más genes.

Crecimiento Incremento en el número de células.

Crecimiento exponencial Crecimiento de un microorganismo cuyo número de células se duplica en un periodo constante de tiempo.

Crenarchaeota Un phylum de *Archaea* que contiene microorganismos hipertermófilos y psicrófilos.

Cromosoma Un elemento genético, generalmente circular en procariotas y lineal en eucariotas, que lleva genes esenciales para el funcionamiento de la célula.

Cromosomas artificiales Vectores de clonación que pueden llevar grandes insertos de DNA heterólogo y que permanecen en la célula como si fuese un cromosoma extra. Los más utilizados son los bacterianos (BAC) y los de levaduras (YAC).

Crónica Infección de larga duración.

Cronómetro evolutivo Una molécula, tal como el RNA ribosómico, cuya secuencia molecular puede utilizarse para medir divergencias evolutivas.

Cuarentena La práctica de restringir el desplazamiento de individuos con enfermedades altamente contagiosas, con el fin de evitar la difusión de la enfermedad.

Cultivo axénico o puro Un cultivo microbiano que contiene una única clase de microorganismo.

Cultivo de enriquecimiento Método de obtención de cultivos de laboratorio de microorganismos a partir de una muestra natural por medio de cultivos altamente selectivos.

Cultivo monofásico o en batch Cultivo microbiano que funciona como un sistema cerrado de volumen constante.

Chaperones moleculares Grupo de proteínas que ayuda a otras proteínas a plegarse o replegarse a partir de un estado desnaturalizado.

Chimenea negra Fuente hidrotermal submarina extremadamente caliente (250-350°C), que expulsa agua a elevada temperatura y minerales diversos.

DAPI (4′,6-diamino-2-fenilindol) Colorante fluorescente inespecífico para la tinción de bacterias en muestras naturales.

Decloración reductora Eliminación de Cl como Cl^- de un compuesto orgánico, reduciendo el átomo de carbono de C—Cl a C—H.

Delección clonal Eliminación, en el timo, de los linfocitos T autorreactivos y los no reactivos.

Demanda biológica de oxígeno (DBO) Es la cantidad de oxígeno disuelto en el agua consumido por los microorganismos para la completa oxidación del material, tanto orgánico como inorgánico, en una muestra de agua.

Deriva antigénica Pequeños cambios en los antígenos debidos a mutaciones génicas en el virus de la gripe.

Descontaminación Tratamiento que hace que un objeto o superficie inanimada sea manipulable sin riesgo.

Desinfección El proceso de eliminación de prácticamente todos los patógenos, pero no todos los microorganismos, de objetos inanimados o de superficies.

Desnaturalización Eliminación del plegamiento correcto de una proteína que conduce (generalmente) a la pérdida de la actividad biológica.

Desnitrificación Respiración anaeróbica en la que el NO_3^- se reduce a compuestos nitrogenados gaseosos, fundamentalmente N_2.

Desproporción Desdoblamiento de un compuesto en dos nuevos compuestos, uno más oxidado y otro más reducido que el compuesto original.

Determinante antigénico La parte del antígeno que reacciona específicamente con un anticuerpo o un receptor de la célula T; se llama también epítopo.

Dioxigenasa Enzima que cataliza la incorporación de los dos átomos del O_2 en un sustrato.

Disrupción génica Uso de técnicas genéticas para inactivar un gen mediante la inserción en su interior de un fragmento de DNA conteniendo un marcador fácilmente seleccionable. El fragmento insertado se denomina *casete*, y el proceso de inserción *mutagénesis por casete*.

Distancia evolutiva En el árbol filogenético, la suma de las distancias físicas que separan dos organismos de su antecesor común en un árbol; esta distancia es inversamente proporcional a su relación evolutiva.

Divisoma Complejo proteico implicado en procesos de división celular en procariotas.

DNA Ácido desoxirribonucleico, material hereditario de las células y de algunos virus.

DNA girasa reversa Proteína universalmente presente en los hipertermófilos que introduce enrollamientos positivos en el DNA circular.

DNA polimerasa Una enzima que sintetiza una nueva cadena de DNA en la dirección 5′ → 3′ usando una cadena antiparalela de DNA como molde.

DNA sintético Molécula de DNA sintetizada químicamente en el laboratorio.

Dominio Región de una proteína que generalmente posee un plegamiento definido y una función determinada.

Donador de electrones Una sustancia que puede ceder electrones a un aceptor y que se oxida durante el proceso.

Drenaje ácido de las minas Agua ácida que contine H_2SO_4 procedente de la oxidación microbiana de minerales de sulfuro de hierro.

Ecología Estudio de los organismos en sus ambientes naturales.

Ecología microbiana Estudio de la interacción de los microorganismos entre sí y con el medio.

Ecosistema Una comunidad de organismos en su medio natural.

Ecotipo Una población de células genéticamente idénticas que comparten un medio (recurso) particular dentro de un nicho ecológico.

Edición de RNA Modificación del transcrito de RNA, diferente al procesado normal de RNA, para llegar a una molécula totalmente funcional.

Ehrlichiosis De las enfermedades transmitidas por garrapatas, causadas por ricketsias del género *Ehrlichia*.

Electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente (DGGE) Técnica electroforética que puede separar fragmentos de ácido nucleico del mismo tamaño pero de distinta secuencia.

Electroporación El uso de un pulso eléctrico para inducir a las células a tomar DNA libre.

Elemento transponible Elemento genético que tiene la capacidad de moverse (transponerse) de un sitio de un cromosoma a otro.

ELISA Enzimoinmunoanálisis.

Enantiomorfo Una forma de una molécula que es la imagen especular de otra forma de la misma molécula.

Endémica Enfermedad constantemente presente, habitualmente en bajo número.

Endosimbiosis Una teoría que propone que la mitocondria y el cloroplasto fueron inicialmente *Bacteria* de vida libre que establecieron una residencia permanente en las células eucarióticas primitivas, dando origen finalmente a la célula eucariótica moderna.

Endospora Una forma de resistencia al calor y otras condiciones ambientales, rodeada por una gruesa pared que se origina por diferenciación en algunas *Bacteria* Gram positivas.

Endotérmica Que requiere energía.

Endotoxina Fracción del lipopolisacárido de la pared celular de algunas bacterias Gram negativas, que al solubilizarse actúa como una toxina.

Energía de activación Es la energía requerida para llevar al sustrato a un estado reactivo.

Energía libre Energía disponible para la realización de un trabajo (se representa por *G*).

Enfermedad Daño que se produce en un hospedador y que afecta a su capacidad funcional.

Enfermedad de Lyme Enfermedad emergente transmitida por las garrapatas y causada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*.

Enfermedad de transmisión sexual (STD) Enfermedad cuya forma habitual de transmisión es por contacto sexual.

Enlace covalente Un tipo de enlace químico en el que dos atómos comparten electrones.

Enlace fosfodiéster Un tipo de enlace covalente que une a los nucleótidos de un polinucleótido.

Enlace glicosídico Un tipo de enlace covalente que une monosacáridos para formar un polisacárido.

Enlace peptídico Un tipo de enlace covalente entre los aminoácidos de un polipéptido.

Enterotoxina Proteína liberada por un organismo mientras se multiplica (*véase* exotoxina) y que actúa sobre el intestino delgado.

Envasado Proceso de almacenamiento de alimentos en un recipiente cerrado y posterior calentamiento para destruir los microorganismos vivos.

Enzima Una proteína que tiene la capacidad de acelerar (catalizar) una reacción química específica.

Enzima alostérica Una enzima que contiene dos sitios combinantes, el sitio activo (donde se une el sustrado) y el sitio alostérico (donde se une una molécula efectora).

Enzima de restricción Enzima que reconoce y rompe DNA de doble cadena en sitios específicos de la secuencia de DNA.

Enzima inmobilizada Una enzima unida a un soporte sólido sobre el que se pasa el sustrato y se convierte en producto.

Enzimas Proteínas catalíticas que funcionan acelerando las reacciones químicas.

Epidémia Aparición de una enfermedad en un número de personas muy elevado, en una región localizada.

Epidemia con origen común Epidemia que resulta al infectarse un gran número de personas por una misma fuente de contaminación.

Epidemia de persona a persona Epidemia que resulta del contacto entre dos personas, caracterizada por una gradual elevación y descenso del número de casos.

Epidemiología Estudio de la incidencia, distribución y control de las enfermedades infecciosas.

Epitopo Porción de un antígeno que es reconocida por una inmunoglobulina o un receptor de célula T.

Escabeche Proceso de acidificación de los alimentos para prevenir el crecimiento de microorganismos y su alteración.

Escalado o cambio de escala Adaptación de un proceso industrial desde las condiciones de un pequeño de laboratorio las de una fermentación comercial a gran escala.

Escarlatina Característica erupción rojiza como resultado de la presencia de una exotoxina producida por *Streptococcus pyogenes*.

Escrutinio (screening) Cualquiera de los procedimientos que permite clasificar organismos por el fenotipo o el genotipo, pero permite el crecimiento de todos los posibles.

Especie En microbiología, una colección de cepas que comparten un gran número de propiedades importantes pero difieren en una o más propiedades significativas de otras colecciones de cepas.

Especificidad Característica de la respuesta inmune para interaccionar selectivamente con antígenos individuales.

Espiroqueta Un procariota alargado y fuertemente curvado o helicoidal que se caracterizan por poseer filamentos axiales para su movilidad).

Esporozoos Protozoos parásitos inmóviles.

Estéril Ausencia de cualquier organismo vivo y de virus.

Esterilización La muerte o eliminación de todos los organismos vivos y sus virus de un medio de crecimiento.

Estromatolitos Masas microbianas laminadas, típicamente construidas por capas de organismos filamentosos y no filamentosos que pueden encontrarse fosilizadas.

Estructura cuaternaria El número y disposición de los polipéptidos individuales en la molécula final de una proteína.

Estructura primaria La secuencia precisa de las unidades monoméricas en una macromolécula portadora de información, como por ejemplo en un polipéptido.

Estructura secundaria El modo inicial de plegamiento de un polipéptido o polinucleótido, normalmente dependiente de las posibilidades de establecer puentes de hidrógeno.

Estructura terciaria El plegamiento final de un polipéptido que previamente ha adoptado su estructura secundaria.

Eucariota Una célula con un núcleo delimitado por una membrana nuclear y que en general presenta otros orgánulos, pertenecientes al dominio *Eukarya*.

Eukarya Todas las células eucarióticas: algas, protozoos hongos, hongos mucosos, plantas y animales.

Euryarchaeota Un phylum de *Archaea* que comprende microorganismos metanogénicos principalmente, halófilos extremos y el género *Thermoplasma*.

Evolución Cambio de una línea de descendencia a lo largo del tiempo para dar origen a la producción de una nueva especie o variedad.

Exón La secuencia codificante de un gen (lo contrario que un intrón).

Exotérmica Que libera energía.

Exotoxina Proteína liberada por un microorganismo durante el crecimiento y que posee efectos tóxicos sobre las células del hospedador.

Extremoenzyma Una enzima capaz de funcionar en presencia de una o varias condiciones físicas o químicas extremas, por ejemplo a altas temperaturas o bajo pH.

Extremófilo Un organismo que crece de modo óptimo en una o más condiciones físicas o químicas extremas, como por ejemplo a alta o baja temperatura o pH.

Facultativo Con respecto al O_2, un organismo que puede crecer en su ausencia o en su presencia.

Fagocitosis Proceso por el cual una partícula es englobada por la membrana citoplasmática e internalizada.

FAME Metil éster de ácido graso.

Familia En la clasificación biológica, un nivel intermedio de jerarquía taxonómica. Contiene uno o más géneros, cada uno con una o más especies.

Familia génica Genes relacionados por su secuencia con otros genes del mismo organismo.

Fase estacionaria El periodo que sigue al crecimiento exponencial cuando la velocidad de crecimiento de la población es cero.

Fase lag Periodo anterior a la fase de crecimiento exponencial cuando las células pueden tener un metabolismo activo pero aún no crecen.

Fenotipo Las características observables de un organismo.

Fermentación Catabolismo anaeróbico en el que un compuesto orgánico sirve al mismo tiempo como donador y como aceptor de electrones y en el que el ATP se produce por fosforilación a nivel de sustrato.

Fermentador El tanque en el que se realiza una fermentación industrial.

Ficobiliproteína Complejo pigmentario accesorio de las cianobacterias que contiene una molécula de ficocianina o ficoeritrina acoplada a proteínas.

Fiebre Aumento en la temperatura corporal por encima de lo normal.

Fiebre reumática Enfermedad inflamatoria autoinmune producida por una respuesta inmunitaria frente a una infección por *Streptococcus pyogenes*.

Fijación de nitrógeno Reducción biológica de N_2 a NH_3 por la nitrogenasa.

Filogenia Relaciones evolutivas entre organismos.

Filtración Eliminación de las partículas en suspensión del agua mediante el paso de ésta a través de una o varias membranas o medios permeables (por ejemplo, arena, antracita o tierra de diatomeas).

FISH Hibridación fluorescente *in situ*.

Fisión binaria División celular que sigue al aumentar una célula dos veces su tamaño mínimo.

Fitanil Cadena hidrocarbonada de 20 átomos de carbono, ramificada y presente en los lípidos de *Archaea*.

Flagelados Un grupo de protozoos caracterizados por su movilidad, producida por un apéndice largo que se mueve como un látigo.

Flagelo Un apéndice largo y delgado con capacidad de rotación que se presenta en algunos procariotas y es responsable de su propulsión en medios líquidos.

Floculación Proceso de tratamiento del agua, posterior a la coagulación, que mediante una ligera agitación hace que las partículas suspendidas formen masas agregadas de mayor tamaño (flóculos).

Fómites Objetos inanimados que, si se contaminan con un patógeno viable, pueden transferir el patógeno al hospedador.

Forma replicativa Molécula de DNA bicatenario que es un intermediario en la replicación de virus con DNA unicatenario.

Fotofosforilación Producción de ATP mediante la fuerza motriz de protones formada por reacciones fotosintéticas.

Fosforilación a nivel de sustrato Producción de ATP por transferencia directa de una molécula de fosfato de alta energía desde un compuesto orgánico fosforilado hasta ADP.

Fosforilación oxidativa Producción de ATP a expensas de la fuerza motriz de protones generada por el transporte de electrones.

Fotofosforilación cíclica Reacciones de síntesis de ATP energizadas por la luz en los organismos fototrofos, donde los electrones se desplazan en un ciclo cerrado, estableciendo una fuerza protón motriz.

Fotosíntesis Serie de reacciones en las que se produce la síntesis de ATP por reacciones energizadas por la luz y la fijación de CO_2 dando material celular.

Fotosíntesis anoxigénica Fotosíntesis que no produce O_2.

Fotosíntesis oxigénica Fotosíntesis realizada por cianobacterias, algas y plantas verdes en las que se produce O_2.

Fototaxis Movimiento de un organismo hacia la luz.

Fototrofo Un organismo que utiliza la luz como fuente de energía.

Fraccionamiento isotópico Discriminación por las enzimas de los isótopos *más pesados* de los diversos isótopos de C, S, etc., lo que lleva al enriquecimiento de isótopos más ligeros durante el metabolismo de CO_2, SO_4^{2-}, etc.

FtsZ Una proteína clave en la división celular que forma un anillo a lo largo del plano de división para iniciar la elongación celular.

Fuerza motriz de protones Un estado energético de la membrana que deriva de la separación de la carga y los elementos del agua (H^+ frente a OH^-) a través de la membrana.

Gen Un segmento de DNA que codifica para una proteína (vía mRNA), un tRNA o un rRNA.

Gen indicador Gen incorporado a un vector porque el producto que codifica resulta fácil de detectar.

Generación Espontánea hipótesis que supone que los organismos vivos se pueden originar de materia inerte.

Género Una colección de especies diferentes, que comparten una o más propiedades (generalmente varias propiedades).

Genes de la superfamilia de las inmunoglobulinas Familia de genes que están, evolutiva, estructural y funcionalmente relacionados con las inmunoglobulinas.

Genoma El conjunto de genes contenido en una célula o un virus.

Genómica Disciplina que implica el mapeo, secuenciación y análisis de genomas.

Genotipo Constitución génica precisa de un organismo.

Glicocálix Polisacáridos bacterianos que se extienden fuera de la célula.

Glicolisis Una ruta bioquímica mediante la cual se fermenta la glucosa para producir energía (ATP) y varios productos resultantes de la fermentación. También se denomina ruta de Embden-Meyerhof.

Gram negativa Un tipo de célula procariótica cuya pared celular contiene relativamente poco peptidoglicano y presenta una membrana externa compuesta por lipopolisacárido, lipoproteína y otras macromoléculas complejas.

Gram positiva Tipo de célula procariótica cuya pared celular está compuesta básicamente por peptidoglicano y que carece de membrana externa.

Gremio (*guild*) Conjunto de poblaciones de microorganismos relacionados metabólicamente en un mismo lugar.

Guerra biológica El uso de agentes biológicos para incapacitar o matar a los humanos.

Hábitat Lugar de residencia de una población microbiana en un medio.

Halófilo Un microorganismo que requiere sal (NaCl) para crecer.

Halófilo extremo Un microorganismo que requiere para crecer grandes cantidades de sal (NaCl), por lo general superiores al 10% y a veces próximas a la saturación.

Halorrodopsina Bomba de cloro impulsada por la luz que acumula el ion cloruro en el citoplasma.

Halotolerante Un organismo que no requiere sal (NaCl) para crecer pero que puede crecer en su presencia, en algunos casos, a niveles salinos elevados.

Hapteno Una sustancia de bajo peso molecular que se combina con anticuerpos específicos, pero que es incapaz de desencadenar por sí misma una respuesta inmune.

Heliobacterias Procariotas fototrópicos anoxigénicos que contienen bacterioclorofila *g*.

Hepatitis Inflamación del hígado generalmente causada por un agente infeccioso.

Heterocisto Célula diferenciada de una cianobacteria que lleva a cabo la fijación de nitrógeno pero no la fotosíntesis oxigénica.

Heterofermentativo Relativo a bacterias del ácido láctico, capaces de originar más de un producto de fermentación.

Hibridación fluorescente *in situ* (FISH) Método que emplea un colorante fluorescente incorporado a una sonda nucleotídica específica para la identificación o rastreo de microorganismos en el ambiente.

Hibridación genómica La determinación experimental de las similitudes entre dos genomas mediante la cuantificación del grado de hibridación de los DNA genómicos de dos organismos.

Hibridación Formación de un dúplex de ácido nucleico con bandas que proceden de diferentes fuentes mediante apareamiento de bases complementarias.

Hidrogenasa Enzima capaz de añadir o quitar H_2, ampliamente distribuida entre los microorganismos anaerobios.

Hidrogenosoma Un orgánulo de origen endosimbiótico presente en ciertos microorganismos eucarióticos anaeróbicos que funcionan oxidando el piruvato a hidrógeno, dióxido de carbono y acetato con producción de un ATP.

Hidrotermal Una fuente caliente de las profundidades marinas, o un manantial caliente.

Hipersensibilidad Respuesta inmune que ocasiona un daño en el hospedador, y que a veces se denomina alergia.

Hipertermófilo Microorganismo que tiene una temperatura óptima de 80°C o superior.

HLA Antígenos leucocitarios humanos.

Homofermentativo Relativo a bacterias del ácido láctico y que originan ácido láctico como único producto final de fermentación.

Hongos mucosos Microorganismos eucarióticos no fototróficos que carecen de pared celular y se agregan para formar cuerpos fructíferos o masas de protoplasma.

Hongos Microorganismos eucarióticos no fototrópicos con paredes celulares rígidas.

Hospedador Organismo que alberga a un parásito.

Huella dactilar del DNA Uso de técnicas de la ingeniería genética para determinar el origen del DNA en una muestra de tejido.

Ictericia Exceso en la producción y liberación de bilirrubina en el hígado, debido a la destrucción de los hepatocitos. El resultado es la coloración amarillenta de la piel y los ojos.

In silicio Uso de computadoras para llevar a cabo análisis sofisticados.

Incidencia El número de casos de enfermedad en una población.

Infección Multiplicación de los microorganismos en el hospedador.

Infección alimentaria Enfermedad causada por una infección resultante de la ingestión de alimentos contaminados.

Infección nosocomial Infección adquirida en el hospital.

Infecciones emergentes Enfermedades infecciosas que se cree que estan bajo control y vuelven a aparecer.

Infecciones reemergentes Enfermedades infecciosas cuya incidencia ha aumentado en los últimos 20 años o cuya incidencia amenaza con aumentar en un futuro próximo.

Inflamación Respuesta del hospedador frente a una lesión o infección, que se caracteriza por eritema, hinchazón, calor y dolor.

Ingeniería genética Uso de técnicas *in vitro* para conseguir el aislamiento, la manipulación, la recombinación y la expresión del DNA, así como para desarrollar *organismos genéticamente modificados*.

Inhibición La reducción del crecimiento microbiano debido a un descenso en el número de microorganismos presentes o alteraciones en el ambiente microbiano.

Inhibición por retroalimentación Una disminución en la actividad de la primera enzima de una ruta causada por el producto final de la misma.

Inhibidor de proteasas Compuesto que inhibe la proteasa vírica al unirse directamente al sitio catalítico de ésta, evitando la actividad catalítica de la proteasa.

UNIVERSIDAD DE TALCA

Inhibidor no nucleósido de la transciptasa inversa (NRTI) Compuesto análogo a los nucleósidos que inhibe la transcriptasa inversa (reversa) de los virus por competición con los nucleósidos.

Iniciador Una molécula (generalmente un polinucleótido) al cual la DNA polimerasa puede unir el primer desoxirribonucleótido nucleótido durante la replicación del DNA.

Inmunidad Capacidad de un organismo para combatir, de forma específica, una infección.

Inmunidad de grupo Resistencia de un grupo a un patógeno, como resultado de la inmunidad de una gran proporción de los miembros del grupo.

Inmunidad mediada por anticuerpos (humoral) Inmunidad producida por la estimulación de linfocitos B y que implica la interacción directa del antígeno con los anticuerpos.

Inmunidad mediada por células (CMI) Inmunidad debida a células T específicas de antígeno.

Inmunización (vacunación) Inoculación del hospedador con patógenos inactivados y atenuados, o productos de patógenos para estimular la protección inmunitaria.

Inmunógeno Molécula capaz de desencadenar una respuesta inmune.

Inmunoglobulina (Ig) Proteína soluble, producida por los linfocitos B que interacciona con el antígeno; también se le conoce como anticuerpo.

Inmunotransferencia (western blotting) Electroforesis de proteínas seguida de transferencia a una membrana y detección mediante adición de anticuerpos específicos.

INNTR Inhibidor no nucleosídico de la transcriptasa reversa.

Interferones Proteínas antivíricas específicas del hospedador, que impiden la infección de las células vecinas.

Intoxicación alimentaria Enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos que contienen toxinas microbianas.

INTR Inhibidor nucleosídico de la transcriptasa reversa.

Intrón Las secuencias no codificantes que separan los exones en un gen partido.

Invasividad Capacidad de un patógeno para introducirse en el hospedador y diseminarse.

IP Inhibidor de la proteasa.

Irradiación Exposición de los alimentos a una radiación ionizante con el propósito de inhibir el crecimiento de microorganismos, insectos o de retardar el crecimiento y/o maduración.

«Korarchaeota» Un phylum de *Archaea* hipertermófilos que se ramificó en la base del tronco *Archaea*.

Leghemoglobina Una proteína captadora de O_2 de los nódulos radicales.

Leucocito polimorfonuclear (PMN, neutrófilo) Una clase de leucocitos con propiedades fagocíticas, citoplasma granular y núcleo multilobulado como, por ejemplo, los neutrófilos.

Leucocitos Células nucleadas que se hallan en la sangre (células blancas de la sangre).

Levaduras Hongos unicelulares.

Linfa Un líquido parecido a la sangre pero carente de eritrocitos y que fluye por un sistema circulatorio distinto (el sistema linfático) que consta de ganglios linfáticos cuya función es filtrar material particulado (v. g., bacterias).

Linfocitos Una subpoblación de células nucleadas de la sangre que participan en una respuesta inmune.

Liofilización Proceso de eliminación del agua de alimentos congelados bajo condiciones de vacío.

Lípido Glicerol unido a ácidos grasos o a otras moléculas hidrofóbicas por enlace éster o éter. A menudo, también contiene otros grupos, como fosfato.

Lipopolisacárido (LPS) Lípido que contiene polisacárido y proteína y que es el compuesto mayoritario en la pared celular de las *Bacteria* Gram negativas.

Liquen Un hongo y una alga (o cianobacteria) que viven en asociación simbiótica.

Lisis Pérdida de la integridad celular con liberación del contenido citoplasmático.

Lisógeno Una bacteria que contiene un profago.

Listeriosis Infección alimentaria intestinal causada por *Listeria monocytogenes* que puede producir septicemia y meningitis.

Lixiviado microbiano Eliminación por la actividad microbiana de metales valiosos como Cu^{2+} de menas de sulfuro.

Lixiviado Solubilización y eliminación de metales de las menas minerales por ataque microbiano.

Macrófago Una clase de leucocitos de tamaño grande con capacidad fagocítica.

Macromolécula Polímero formado por monómeros unidos covalentemente.

Magnetosomas Partículas de magnetita (Fe_3O_4) que forman una estructura rodeada por una membrana no lípido-proteica (no una unidad de membrana) en las *Bacteria* magnetotácticas.

Malaria Enfermedad transmitida por insectos, caracterizada por episodios recurrentes de fiebre y anemia causada por el protozoo *Plasmodium spp.*, habitualmente transmitida a los mamíferos a través de la picadura del mosquito *Anopheles*.

Mapa genético Ordenación de genes en un cromosoma.

Marco de lectura abierta (ORF) Una secuencia de DNA que al ser transcrita origina una proteína de composición definida. Un marco funcional es el que codifica una proteína celular.

Materias primas químicas Productos químicos como el etanol que tienen un vajo valor monetario y se venden principalmente a granel.

Medio complejo Un medio de cultivo compuesto por hidrolizados de sustancias químicas no definidas, como extractos de levadura o de carne.

Medio de cultivo Una solución acuosa de varios nutrientes que permite el crecimiento de los microorganismos.

Medio definido Un medio de cultivo del que se conoce su composición química exacta.

Medio diferencial Medio que permite la identificación de microorganismos basados en su apariencia.

Medio enriquecido Medio que permite el crecimiento de microorganismos porque tiene añadidos factores de crecimiento.

Medio para propósito general Medio que soporta el crecimiento de la mayoría de aeróbicos y anaeróbicos falcultativos.

Medio selectivo Medio que permite el crecimiento de unos organismos retrasando el crecimiento de otros, debido a que tiene un componente añadido.

Meiosis Proceso de división nuclear durante la gametogénesis en el que la repetición cromosómica pasa de dos (diploide) a una sola copia de cada cromosoma (haploide).

Membrana citoplasmática Barrera con permeabilidad selectiva que envuelve al citoplasma y lo separa del entorno.

Membranas mucosas Capas de células epiteliales que interactúan con el ambiente exterior.

Memoria inmunológica Capacidad de producir rápidamente grandes cantidades de células inmunes o anticuerpos específicos tras una nueva exposición a un mismo antígeno.

Meningitis Inflamación de las meninges (membranas que recubren el cerebro) algunas veces causada por *Neisseria meningitidis* y caracterizada por repentino dolor de cabeza, vómitos y rigidez del cuello, frecuentemente produce coma en pocas horas.

Meningococemia Enfermedad fulminante causada por *Neisseria meningitidis* caracterizada por septicemia, coagulación intravascular y schock.

Meningoencefalitis Invasión, inflamación y destrucción del tejido cerebral producido por la ameba *Naegleria fowlerii* u otros patógenos.

Mesófilo Un organismo que crece mejor a temperaturas entre 20°C y 45°C.

Metabolismo Conjunto de reacciones bioquímicas de una célula.

Metabolito primario Un metabolito que se excreta durante la fase logarítmica de crecimiento.

Metabolito secundario Un metabolito que se excreta al final de la fase logarítmica de crecimiento y en la fase estacionaria de crecimiento.

Metanogénesis Producción biológica de metano (CH_4).

Metanógeno Término que alude a un procariota productor de gas metano.

Metanotrofia Nutrición a partir de la oxidación de metano.

Metanotrofo Un organismo capaz de oxidar metano (CH_4).

Metazoos Organismos pluricelulares.

Metilotrofia Metabolismo energético en el que grupos metilo o el metano son oxidados como donadores de electrones.

Metilotrofo Un organismo capaz de oxidar compuestos orgánicos que no contiene enlaces carbono-carbono; si es capaz de oxidar metano también es metanotrófico.

MHC de clase I Proteína presentadora de antígenos presente en todas las células nucleadas de vertebrados.

MHC de clase II Proteína presentadora de antígenos presente en macrófagos, linfocitos B y células dendríticas (células presentadoras de antígeno).

Micorriza Asociación simbiótica entre un hongo y las raíces de una planta.

Micosis Enfermedades causadas por hongos.

Microaerófilo Organismo aeróbico que puede crecer sólo cuando la presión parcial del oxigeno es menor que la del aire.

Microambiente El medio inmediato que rodea una célula microbiana o un grupo de células.

Microelectrodo Electrodo pequeño de cristal para medir el pH o compuestos específicos, O_2, H_2S, etc., que se pueden introducir en un hábitat microbiano a intervalos de microescala.

Microorganismo Organismo microscópico constituido por una sola célula o varias, incluyendo los virus.

Mitocrondria Orgánulo respiratorio de los organismos eucarióticos.

Mitosis Proceso de replicación y partición de los cromosomas en las células eucarióticas que van a las células hijas.

Mixotrófico Estado nutricional en el que un compuesto inorgánico sirve como fuente de energía (donador de electrones) y uno o varios compuestos orgánicos sirven como fuente de carbono.

Mohos Hongos filamentosos.

Molécula Dos o más átomos unidos químicamente entre sí.

Monooxigenasa Enzima que cataliza la incorporación de un átomo del O_2 en un sustrato, mientras que el otro átomo se reduce a H_2O.

Morbilidad Incidencia de una enfermedad en una población.

Morfología Forma celular.

Mortalidad Incidencia de muertes en una población.

Motivo Secuencia conservada de aminoácidos que se encuentra en todos los péptidos antigénicos que se unen a una determinada proteína del MHC.

Movimiento ameboide Un tipo de movilidad, en que el movimiento del citoplasma impulsa al organismo hacia adelante.

Mutación Cambio heredable en la secuencia de bases del genoma de un organismo.

Mutación puntual Mutación que afecta sólo a un par o unos pocos pares de bases.

Mutagénesis dirigida Técnica por la que puede construirse *in vitro* un gen con una mutación específica.

Mutágenos Agentes que causan mutación.

Mutante Organismo cuyo genoma lleva una mutación.

Nitrificación Proceso por el que NH_3 es oxidado a NO_3^-.

Nitrogenasa Enzima capaz de reducir N_2 a NH_3 en el proceso de fijación del nitrógeno.

Nódulo radical Crecimiento en forma de tumoración en raíces de plantas que contiene bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno.

Núcleo Una estructura rodeada por una membrana que contiene los cromosomas en células eucarióticas.

Nucleoide Masa total de DNA que constituye el cromosoma de las células procarióticas (*Bacteria* y *Archaea*).

Nucleósido Un nucleótido sin su grupo fosfato.

Nucleótido Un monómero de un ácido nucleico que contiene una base nitrogenada (adenina, guanina, citosina, timina o uracilo), una molécula de fosfato y un azúcar, bien sea ribosa (en el RNA) o desoxirribosa (en el DNA).

Número más probable (NMP) Dilución seriada de una muestra natural para determinar la mayor dilución que produce crecimiento.

Oncogen Un gen cuya expresión causa la formación de un tumor.

Operón Uno o más genes transcritos en un único RNA bajo el control de un único sitio regulador. Sin embargo, el término se utiliza para describir una unidad de transcripción que contiene más de un gen.

Organismo genéticamente modificado (GMO) Organismo cuyo genoma ha sido modificado utilizando métodos de la ingeniería genética. El acrónimo *GM* también se utiliza en construcciones tales como *cosechas GM* y *alimentos GM*.

Organismos transgénicos Plantas o animales que incorporan de forma estable DNA clonado que ha sido introducido dentro de ellos.

Orgánulo Estructuras del tamaño de bacterias, rodeadas de una unidad de membrana y especializadas en funciones metabólicas que se encuentran dentro de las células eucarióticas.

Ortólogos Genes que se encuentran en un organismo y que son similares a los de otro organismo pero que difieren por el propio proceso de especiación (véase también *Parálogos*).

Óxico Con oxígeno (se aplica principalmente a un medio de cultivo, hábitat o ambiente).

Pandemia Epidemia de ámbito mundial.

Parálogos Genes de un organismo cuya similaridad es el resultado de una duplicación génica en algún punto de la evolución del organismo (véase también *Ortólogos*).

Parásito Organismo capaz de multiplicarse en un hospedador y producirle daño.

Pasteurización Destrucción de todos los microorganismos productores de enfermedades o reducción en el número de microorganismos alterantes.

Patogenicidad Capacidad de un parásito para causar daño en un hospedador.

Patógeno Un microrganismo parasito que causa daño al hospedador.

Penicilina biosintética Producción de una forma particular de penicilina aportando al organismo los precursores específicos de la cadena lateral.

Penicilina semisintética Una penicilina obtenida a partir de compuestos producidos por fermentación microbiana y síntesis química.

Peptidoglicano Una molécula polisacarídica formada por unidades repetitivas y alternantes de acetilglucosamina y ácido acetilmurámico y péptidos cortos que forma capas adyacentes unidas a través de puentes peptídicos.

Periplasma Región gelatinosa entre la capa externa de la membrana citoplasmática y la superficie interna de la capa de lipopolisacárido de las *Bacteria* Gram negativas.

Peritrico Modelo de flagelación en el que los flagelos se localizan alrededor de la superficie celular.

Peste Enfermedad epidémica transmitida por los roedores y causada por *Yersinia pestis*, y ocasionalmente transmitida a los hombres por la picadura de una pulga.

pH Valor negativo del logaritmo de la concentración de iones hidrógeno (H^+) en una solución.

Phylum Principal linaje de células en uno de los tres dominios de vida.

Pinzas de láser Instrumento para obtener cultivos axénicos mediante el cual una célula individual puede ser atrapada con un haz de láser y separarse de las células circundantes para ponerla en un medio de cultivo estéril.

Pirita Un mineral de hierro, el FeS_2.

Placa dental Conjunto de células bacterianas incluidas en una matriz de polímeros extracelulares y productos salivares, presentes en los dientes.

Placa Una zona de lisis o inhibición celular causada por la infección vírica de un césped de células sensitivas.

Plasma La parte líquida de la sangre que queda al eliminar las células e inactivar los factores de la coagulación.

Plásmido Elemento genético extracromosomal que no tiene forma extracelular.

Plásmido Ti Plásmido conjugativo presente en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* que puede transferir genes a las plantas.

Plásticos microbianos (bioplásticos) Polímeros biodegradables con propiedades similares a los plásticos sintéticos, obtenidos a partir de microorganismos.

Polar Que posee propiedades hidrofílicas y es generalmente soluble en agua.

Poli-β-hidroxibutirato (PBH) Material de reserva nutritiva presente en procariotas compuesto por un polímero de β-hidroxibutirato u otro tipo de ácido β-alcanoico.

Polímero Un compuesto químico formado por polimerización y que consta de unidades repetitivas llamadas monómeros.

Polimorfismo La existencia de múltiples alelos en un *locus* con una frecuencia que no puede explicarse por la presencia de mutaciones al azar recientes.

Polinucleótido Un polímero de nucleótidos unidos entre si por enlaces fosfodiéster.

Polipéptido Un polímero de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos.

Polisacárido Un polímero de monosacáridos unidos entre sí por enlaces glicosídicos.

Porcentaje de bases GC En el DNA (o RNA) de cualquier organismo, el porcentaje del DNA constituido por guanina y citosina.

Portador Individuo con una infección subclínica, que puede propagar una enfermedad.

Potable Que puede ser consumido por la población.

Potencial de reducción La tendencia intrínseca (medida en voltios) de una sustancia para donar electrones.

Precipitación Reacción entre un anticuerpo y un antigeno soluble que da lugar a un complejo visible e insoluble.

Prevalencia La proporción o porcentaje de individuos de una población que tienen una enfermedad.

Prión Un agente infeccioso cuya forma intracelular puede no contener ácido nucleico.

Procariota Una célula que carece de un núcleo delimitado por una membrana nuclear y de otros orgánulos.

Procesamiento de RNA Conversión de un RNA precursor a su forma madura.

Prochlorophyta Un procariota fototrofo oxigénico que contiene clorofila *a* y *b* pero carecen de ficobilinas.

Productor primario Organismo que usa la luz para sintetizar materia orgánica a partir de CO_2.

Promotor Un sitio en el DNA al cual puede unirse la RNA polimerasa y comenzar la transcripción.

Prosteca Una proyección de citoplasma rodeado de pared celular que a menudo forma un apéndice distintivo.

Proteasa Una enzima que degrada proteínas por hidrólisis.

Proteína Un polipéptido o grupo de polipéptidos que forman una molécula con una función biológica específica.

Proteína activadora Una proteína reguladora que se une a sitios específicos del DNA y activa la transcripción; implicada en el control positivo.

Proteína quinasa detectora Uno de los miembros de un sistema de dos componentes; una quinasa que se encuentra en la membrana celular y que se autofosforila en respuesta a una señal externa y luego pasa el grupo fosforilo a una proteína reguladora de respuesta (*véase* proteína reguladora de la respuesta).

Proteína reguladora de la respuesta Uno de los dos miembros de un sistema de dos componentes; una proteína reguladora que es fosforilada por una proteína quinasa sensora (*véase* proteína quinasa sensora).

Proteína represora Una proteína reguladora que se une a sitios específicos del DNA y bloquea la transcripción; implicada en el control negativo.

Proteínas del MHC clase I Proteínas presentadoras de antígeno que se expresan en todas las células nucleadas de los vertebrados.

Proteínas del MHC clase II Proteínas presentadoras de antígeno, expresadas fundamentalmente en macrófagos, células B y otras células presentadoras de antígeno (como las células dendríticas).

Proteobacteria Un grupo grande de *Bacteria* Gram negativas relacionadas filogenéticamente.

Proteoma El conjunto de proteínas de una célula, tejido u organismo en un momento dado.

Proteómica Estudio global en el ámbito estructural y funcional de todas las proteínas de un organismo.

Proteorrodopsina Proteína sensible a la luz en algunos miembros del dominio *Bacteria* que cataliza la formación de ATP.

Protoplasto Una célula a la que se le ha eliminado la pared celular y sólo es viable en un medio osmótico adecuado.

Protozoos Microorganismos unicelulares eucarióticos no fototróficos que carecen de pared celular.

Provirus (profago) El genoma de un virus temperado cuando se está replicando con, generalmente integrado en, el cromosoma del hospedador.

Proyecto de Base de Datos del Ribosoma (RDP) Una gran base de datos a la que puede accederse electrónicamente y que contiene secuencias del RNA de la subunidad pequeña del ribosoma y se utilizan en estudios de comparación de secuencias del RNA ribosómico.

Pseudomonas Miembro del género bacteriano *Pseudomonas*, un gran grupo de bacterias Gram negativas con metabolismo obligadamente respiratorio (nunca fermentativo).

Psicrófilo Organismo con una temperatura óptima de crecimiento de 15°C o menor y una temperatura máxima de crecimiento inferior a 20°C.

Psicrotolerante Organismo capaz de crecer a bajas temperaturas pero cuya temperatura óptima de crecimiento está por encima de 20°C.

Puente de hidrógeno Un enlace químico débil entre un átomo de hidrógeno y un segundo elemento más electronegativo, normalmente un átomo de oxígeno o de nitrógeno.

Quimiolitotrofo Organismo que obtiene su energía de la oxidación de compuestos inorgánicos.

Quimioorganotrofo Un organismo que obtiene su energía de la oxidación de compuestos orgánicos.

Quimioquina Proteína pequeña, soluble, producida por diferentes células y encargada de modular las reacciones inflamatorias y la inmunidad a través de sus efectos en las células diana.

Quimiostato Aparato que permite el cultivo continuo de microorganismos en el que se pueden controlar independientemente la velocidad de crecimiento y el número de células.

Quimiotaxis Movimiento de un organismo hacia (positivo) o alejándose de (negativo) un gradiente de un compuesto químico.

Quinasa Una enzima que adiciona un grupo fosfato a un compuesto.

Quinolonas Compuestos antibacterianos sintéticos que interaccionan con la DNA girasa e impiden el superenrollamiento del DNA bacteriano.

Quiste Forma infecciosa de un protozoo parásito que se recubre de una delgada pared resistente de naturaleza física y química.

Quitina Un polímero de N-acetil-D-glucosamina que se encuentra habitualmente en las paredes celulares de hongos y algas.

Quorum sensing Rutas reguladoras de *Bacteria* que responden a densidad de población.

Rabia Enfermedad neurológica generalmente mortal causada por el virus de la rabia, transmitida por la mordedura o la saliva de un carnívoro infectado.

Reacción de Stickland Fermentación de un par de aminoácidos en la que uno de ellos sirve como donador de electrones y el segundo como aceptor.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Método usado para amplificar una secuencia específica de DNA *in vitro* por repetidos ciclos de síntesis usando cebadores específicos y DNA polimerasa.

Recalcitrante Resistente al ataque microbiano.

Receptor de célula T (TCR) Receptor proteico de la superficie de los linfocitos T que reconoce específicamente al antígeno.

Recombinación Proceso por el que parte o todas las moléculas de DNA de dos fuentes separadas se intercambian o se juntan en una unidad.

Regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) Variaciones en la secuencia de aminoácidos que tienen lugar en las regiones variables de las Igs o los TCRs en las que ocurren la mayoría de los contactos moleculares con el antígeno (también conocidas como regiones hipervariables).

Regiones hipervariables Variaciones en la secuencia de aminoácidos que tienen lugar en las regiones variables de las Igs o los TCRs en las que ocurren la mayoría de los contactos moleculares con el antígeno (también conocidas como regiones determinantes de la complementariedad).

Replicación semiconservativa Síntesis de DNA que origina nuevas dobles hélices, cada una formada por una cadena parental y otra de nueva síntesis.

Replicación Síntesis de DNA utilizando DNA como molde o templado.

Reservorio Sitios en los que permanecen los agentes infecciosos viables y a partir de los cuales puede ocurrir una infección.

Resistencia a un compuesto antimicrobiano La capacidad adquirida de un microorganismo para crecer en presencia de un compuesto antimicrobiano, al que habitualmente el microorganismo es sensible.

Respiración Proceso en el que un compuesto es oxidado con O_2 (o un sustituto del O_2), que funciona como aceptor terminal de electrones, y que normalmente se acompaña de la producción de ATP por fosforilación oxidativa.

Respiración anaeróbica Respiración en la que alguna sustancia como SO_4^{2-} o NO_3^- sirve como aceptor terminal de electrones en vez de O_2.

Respuesta primaria de anticuerpos Anticuerpos fabricados tras la primera exposición al antígeno; la mayoría son de la clase Ig M.

Respuesta secundaria de anticuerpos Anticuerpos generados tras la segunda o posterior exposición al antígeno; la mayoría son de la clase Ig G.

Retrovirus Un virus cuyo genoma RNA tiene un DNA intermediario como parte de su ciclo replicativo.

RIA *Radioinmunoanálisis.*

Ribosoma Una partícula citoplásmica compuesta de RNA ribosómico y proteína, la cual es parte central de la maquinaria sintetizadora de proteínas de la célula.

Ribotipado Una técnica para identificar microorganismos a partir del análisis de los fragmentos de DNA generados por digestión de los genes que codifican su rRNA 16S con enzimas de restricción.

Ribozima Una molécula de RNA que puede catalizar reacciones químicas.

Rickettsia Parásito intracelular estricto que produce una importante variedad de enfermedades como el tifus, la fiebre de las montañas rocosas y ehrlichiosis.

Rizosfera Región inmediatamente adyacente a las raíces de las plantas.

RNA Ácido ribonucleico, implicado en la síntesis de proteínas como RNA mensajero, RNA de transferencia y RNA ribosómico.

RNA de transferencia (tRNA) Una molécula adaptadora utilizada en la traducción que tiene especificidad por un determinado aminoácido y por uno o más codones.

RNA mensajero (mRNA) Una molécula de RNA que contiene la información necesaria para codificar para una proteína.

RNA polimerasa Una enzima que sintetiza RNA en la dirección 5′ → 3′ usando una cadena antiparalela de DNA como templado.

RNA ribosómico (rRNA) Tipos de RNA encontrados en el ribosoma; algunos participan activamente en el proceso de la síntesis de proteínas.

rRNA 16S Un polinucleótido grande (~1500 bases) que funciona como parte de la subunidad pequeña del ribosoma de procariotas y de cuya secuencia puede obtenerse información evolutiva; el correlativo eucariótico es el rRNA 18S.

Rumen El primer compartimento del estómago de los rumiantes en el que tiene lugar la digestión de la celulosa.

Ruta del acetil-coA (Ljungdahl-Wood) Ruta de fijación autotrófica del CO_2 muy extendida entre anaerobios estrictos tal como los metanógenos, homoacetógenos y bacterias reductoras de sulfato.

Salmonelosis Enterocolitis causada por alguno de los 1400 serotipos de *Salmonella* spp.

Salud pública La salud de la población en conjunto.

Secuencia signatura Oligonucleótido corto de secuencia definida presente en el rRNA 16S o 18S característico de un organismo específico o grupo de organismos relacionados filogenéticamente y útil para la construcción de sondas.

Selección Disposición de los organismos bajo condiciones que favorecen el crecimiento de un determinado genotipo.

Selección clonal Los linfocitos T y B producen copias de sí mismos cuando son estimulados por un antígeno.

Selección negativa En la maduración de los linfocitos T, los que reconocen antígenos propios en el timo son eliminados (*véase* delección clonal).

Selección positiva En la maduración de los linfocitos T, los que en el timo interaccionan con el MHC propio estimulan su crecimiento y desarrollo.

Sensibilidad La más pequeña cantidad de antígeno que puede ser detectada.

Septicemia Infección de la sangre.

Serología Estudio *in vitro* de las reacciones antígeno-anticuerpo.

Sesgo en el enriquecimiento Problema relacionado con el cultivo de enriquecimiento, donde los resultados se desvían por el aislamiento de especies minoritarias en detrimento de organismos de mayor abundancia y significado ecológico en un hábitat.

Setas Hongos filamentosos que producen cuerpos fructíferos macroscópicos, frecuentemente comestibles.

Sideróforos Agentes quelantes de hierro que pueden unir hierro presente en muy bajas concentraciones.

Sífilis congénita Sífilis contraída por un recién nacido a partir de su madre durante el parto.

Síndrome de Shock tóxico (TSS) Shock sistémico agudo que se produce como resultado de la respuesta del sistema inmunitario a la exotoxina producida por *Staphylococcus aureus.*

Síndrome pulmonar por hantavirus (HPS) Enfermedad vírica aguda, emergente, caracterizada por neumonía y transmitida por roedores.

Sintrofia Proceso en el cual dos o más microorganismos cooperan en la degradación de una sustancia que no pueden degradar por sí solos.

Sistema binomial El sistema propuesto por Linneo para denominar a un organismo vivo según el cual a cada organismo se le da un nombre genérico y un epíteto de especie.

Sistema de distribución Cañerías, depósitos de almacenamiento, tanques y otros elementos empleados para distribuir o almacenar el agua potable.

Sistema de dos componentes Un sistema regulador que contiene una proteína quinasa sensora y una proteína reguladora de la respuesta (*véase* proteína sensora y proteína reguladora de la respuesta).

Soluto compatible Una molécula que se acumula en el citoplasma para ajustar la actividad de agua y que no inhibe los procesos bioquímicos.

Solutos compatibles Sustancias orgánicas o inorgánicas acumuladas en el citoplasma de organismos halófilos para mantener la osmolaridad.

Sonda Ver *sonda de ácido nucleico.*

Sonda de ácido nucleico En microbiología clínica, un oligonucleótido corto y de secuencia única que se emplea como sonda de hibridación para la identificación de patógenos (*véase* Capítulo 6 para su empleo generalizado).

Sonda filogenética Un oligonucleótido, algunas veces convertido en fluorescente por la unión de un colorante, con una secuencia complementaria a alguna secuencia signatura del RNA ribosómico.

Suero La porción líquida de la sangre que resulta de la eliminación de los factores de la coagulación y las células.

Sulfatara Emisor volcánico rico en azufre que genera un ambiente ácido y habitado por arqueas hipertermófilas.

Talasemia Condición genética que confiere resistencia a la malaria pero causa una reducción en la eficiencia de los glóbulos rojos por la alteración de una enzima.

Taxonomía La ciencia de la identificación, clasificación y nomenclatura.

T-DNA Segmento del plásmido Ti de la bacteria *Agrobacterium* que se transfiere a las células vegetales.

Técnica aséptica Conjunto de manipulaciones utilizadas para evitar contaminaciones durante el manejo de objetos estériles o de cultivos microbianos.

Temperaturas cardinales Las temperaturas mínima, óptima y máxima que permiten el crecimiento de un organismo determinado.

Terapia génica Tratamiento de una enfermedad causada por la disfunción de un gen, que consiste en la introducción de una copia correcta de dicho gen.

Termófilo Organismo cuya temperatura óptima de crecimiento está entre 45°C y 80°C.

Termosoma Una chaperonina inducida por choque térmico que repliega parcialmente proteínas parcialmente desnaturalizadas por la temperatura en *Archaea* hipertermófilos.

Test de la tuberculina Prueba que se realiza en la piel para detectar si ha existido una infección previa con *Mycobaterium tubercolisis*.

Tétanos Enfermedad que produce una rápida parálisis de los músculos, causado por una toxina producida por *Clostridium tetani*.

Tetraciclinas Una clase de antibióticos que contienen el anillo de naftaceno de cuatro átomos.

Tiempo de generación El tiempo necesario para que una población de células microbianas duplique su número.

Tilacoides Sistemas de sacos membranosos fotosintéticos presentes en el citoplasma de las cianobacterias y en los cloroplastos.

Título En un contexto inmunológico, cantidad de anticuerpo presente en una solución.

Tolerancia Incapacidad para producir una respuesta inmune contra antígenos específicos.

Toxigenicidad Patogenicidad causada por toxinas producidas por un patógeno.

Tracto respiratorio inferior Tráquea, bronquios y pulmones.

Tracto respiratorio superior Nasofaringe, cavidad oral y garganta.

Traducción Síntesis de proteínas utilizando la información genética presente en un RNA mensajero.

Traducción inversa Proceso mental que consiste en utilizar una tabla de codones y la secuencia de una proteína con el fin de obtener la posible secuencia del mRNA o el gen que codificó dicha proteína.

Trancripción reversa El proceso de copiar a DNA la información presente en el RNA.

Transcripción inversa El proceso de copia en el DNA de la información contenida en el RNA.

Transcripción Síntesis de RNA usando un DNA como molde.

Transcrito primario Una molécula de RNA no procesado que es el producto directo de la transcripción.

Transducción Transferencia de genes del huésped de una célula a otra por medio de un virus.

Transferencia horizontal de genes Presencia de un gen en un organismo procedente de otro.

Transferencia interespecífica de hidrógeno La producción y consumo inmediato de H_2 por diferentes grupos de microorganismos que interaccionan estrechamente durante el catabolismo anaeróbico.

Transferencia lateral (horizontal) de genes El intercambio de genes entre todas las células de una comunidad microbiana.

Transformación Transferencia de genes bacterianos que implica DNA libre. Un proceso por el que una célula normal se convierte en una célula cancerosa.

Translocación de grupo Mecanismo de transporte dependiente de energía, en el cual la molécula transportada es modificada químicamente durante el transporte.

Transportador ABC Un sistema transportador de membrana que comprende tres proteínas, una que hidroliza ATP como fuente de energía permitiendo el transporte, otra que une el sustrato en el exterior de la célula y otra que actúa como canal de transporte a través de la membrana.

Transporte inverso de electrones Movimiento de electrones, con consumo de energía, contra el gradiente termodinámico, produciendo un reductor fuerte a partir de un donador de electrones débil.

Transposón Un tipo de elemento transponible que lleva genes adicionales a los implicados en la transposición.

Traspeptidación Formación de puentes peptídicos entre las unidades de ácido nacetil murámico durante la síntesis de peptidoglicano.

Tratamiento secundario En el tratamiento de aguas residuales, la descomposición tanto aeróbica como anóxica de las aguas residuales, después de retirar los objetos no degradables pOor tratamiento primario.

Tubo de infección En la formación de nódulos radicales, el tubo de celulosa a través del cual las células de *Rhizobium* se desplazan hasta alcanzar e infectar las células de la raíz.

Turbidez Medida de las partículas suspendidas en el agua.

Vector Agente vivo que transfiere un patógeno (*véase* el otro uso de la palabra en el Capítulo 31).

Vector de clonación Elemento genético en el que los genes pueden replicarse y recombinarse.

Vector de expresión Vector de clonación que contiene las secuencias reguladoras necesarias para permitir la transcripción y la traducción de genes clonados.

Vector de integración Vector de clonación que se integra en el cromosoma de un hospedador.

Vector lanzadera Vector de clonación que puede replicarse en dos o más hospedadores distintos.

Vehículo Fuente inanimada de patógenos que infecta a gran número de individuos. Vehículos comunes son los alimentos y el agua.

Vesículas de gas Estructuras citoplasmáticas llenas de gas y limitadas por proteínas que permiten la flotabilidad de las células.

Vida con RNA Una forma de vida carente de DNA y proteína que pudo haber existido en la Tierra primitiva y en la que el RNA servía a la vez de material genético y catalítico.

Vigilancia Observación, reconocimiento y declaración de las enfermedades cuando aparecen.

Virión La partícula del virus completa; el ácido nucleico rodeado de una cubierta proteica o, a veces, de otro material.

Viroide Pequeño, circular, de cadena sencilla.

Virulencia Grado de patogenicidad que es capaz de producir un determinado patógeno.

Virus atemperado Un virus cuyo genoma es capaz de replicarse junto con el de su hospedador y no causa muerte celular en un estado denominado lisogenia.

Virus virulento Un virus que lisa o mata la célula hospedadora después de la infección; un virus no temperado.

Virus Un elemento genético que contiene RNA o DNA y se replica dentro de las células pero se caracteriza también por tener un estado extracelular.

Xenobiótico Producto totalmente sintético que no se da en la naturaleza.

Xerófilo Organismo que es capaz de vivir, o que vive mejor, en ambientes muy secos.

Zoonosis Enfermedad que ocurre primordialmente en los animales, pero puede ser transmitida a las personas.

Índice

Abacivir, 709
Abequosa, 80
ABO grupo sanguíneo, 818
Abomasum, 651
Absceso, 754
  abcesos, cultivo del material de, 800-1
Absorción, espectro de, 542
Abzyma, 787
Acantilados de Dover, 48
Ácaros, 912
Acaryochloris, 422,423
Aceite de inmersión, lentes, 58
Aceptor final de electrones, 116, 119
Acetaldehído, 121, 406
Acetato quinasa, 584
Acetato, 396-7, 411, 449, 472, 727
  bacterias reductoras de sulfato, 572
  conversión a metano, 450, 577-78, 647
  fuente de carbono y energía, 488, 490
  metanogénesis, 577-579
  oxidación beta, 648
  oxidación, 574-75, 580
  producto de fermentación, 376, 406, 583-85, 587, 646-47
  rumen, 651-53
Acetil fosfato, 118, 572, 583, 584
Acetilasas, 713
Acetil-CoA, 118, 119,406, 472, 572, 574-75, 583-84, 590, 595
  carboxilación, 557
  ciclo del ácido cítrico, 129-30
  estructura, 592
  síntesis de ácidos grasos, 134
  síntesis, 592
Acetil-CoA, vía, 442-43, 572, 574, 578
Acetileno, 40, 586
Acetileno (ensayo de reducción), nitrogenasa, 601
Acetitomaculum ruminis, 574
Acetoacetato, 406
Acetoacetil-ACP, 134
Acetoacetil-CoA, 406
Acetoanaerobium noterae, 574
Acetobacter, 354, 372, 608, 974-75
  aceti, 372
  diazotrophicus, 598, 684
Acetobacterium, 415, 585-86
  wieringae, 574
  woodii, 574
Acetogénesis, 573-74, 633, 647-48
  hábitat acetogénicos, 649
  termes, 650
Acetogenium kivui, 574
Acetoína, 375, 401
a.-Acetolactato, 375
Acetona,
  producción comercial, 577
  producto de fermentación, 406, 585
Acetosiringona, 676
Acetotrófico, metanógeno, 449-50
Acetotrofo, 442
Acholeplasma, 409
Achromatium, 30, 361-2
Achromobacter, 944
Aciclovir, 709, 895
Acidaminococcus fermentans, 586
Acidez, 158-59
Acidianus, 458-59
Ácido alantoico, 682
Ácido alcohol resistencia, 352, 412
Ácido anhídrido, 41
Ácido aspártico,
  producción comercial, 970
Ácido capróico, 80
Ácido cítrico,
  deficiente en hierro, 975
  estructura, 976
  producción comercial, 975-76
Ácido desoxiribonucleico, *véase* DNA
Ácido diaminopimélico (DAP), 74, 76, 142
Ácido dipicolínico, 96, 98, 408, 690
Ácido esteárico, 80
Ácido láctico, bacterias, 30, 106, 122, 398-403, 892, 944-45
  características, 402
  cultivo de enriquecimiento, 609
  heterofermentativo, 352, 400, 401
  homofermentativo, 352, 400, 401
Ácido láctico, producción comercial, 983
Ácido mirístico, 80
Ácido *p*-aminobenzoico, 703
Ácido shikímico, 961
Acidófilo estricto, 158
Acidófilo, 29, 138, 158, 659, 973
  estricto, 158
Ácidos grasos, 338, 597
  cadena larga, 434, 680-81
  cadena ramificada, 133-34
  de triglicéridos y fosfolípidos, 597
  estructura, 45-6
  insaturados, 133, 145-46, 155, 157, 165, 646
  no saturados, 133, 155, 157
  oxidación, 396, 597
  poliinsaturados, 155
  ramificado de cadena impar de átomos de C, 133-134
  ramificados, 133-34, 145-46
  saturados, 157
  síntesis, 133-34
  volátiles, 651-52
Acidosis, 653
Acidovorax facilus, 365
Acineto, 421
Acinetobacter, 92, 283, 301, 354, 374-75, 721, 722, 805, 944
  resistencia antimicrobiana, 714
Acné, 722, 885
Aconitato, 129, 586
Acoplamiento traduccional, 995
ACP, *véase* proteína transportadora de grupos acilo
Acridina (naranja de), 60, 287, 562, 629
Acridina, 272
Acrilato, 584, 658
Actinia, 475
  proteína procariótica similar a, 140
Actinomicetos, 414-16, 594
  esporas, 632
  fijación de nitrógeno, 415
  filamentosos, 414-16
Actinomicina, 700, 705, 961
Actinomyces, 415, 721-22
Actinoplanes, 415
Actinorrodina, 700
Activa seca, 977
  alimentación seca, 976
  cervecera, 485
  ciclo biológico, 475-76
  clonación en, 995
  de fondo, 980
  de panadería, 485, 976
  fermentación, 123
    alcohólica, 978-83
  genética, 475-76
  herencia mitocondrial, 507
  LexA, proteína, 273-74
  nutrición, 977-78
  patógenas, 921
  producción industrial, 976-77
  solutos compatibles, 160-61
  tipo sexual, 475-76, 485
  torta comprimida, 977
  usos industriales, 976
Activación, energía de, 103, 111
Activador,
  tisular del plasminógeno, 1001, 1004, 1008
  sitio de unión del, 217
Actividad de agua,
  acho-específico, polo, 267
  alimentos, 159, 943-45
  crecimiento y, 159-71
  endosporas, 690
  suelo, 159, 632
Adaptación, 227-28
Adaptador, 307
Addison, enfermedad de, 775
Adenilato ciclasa, 738-39
Adenililación, 210-11
Adenina, 46, 47, 48, 171, 172
Adenosín
  desaminasa, 1010
  fosfosulfato (APS), 571-72, 583
  trifosfato, *véase* ATP
Adenosina difosfato (ADP), 584
Adenosina difosfoglucosa (ADPG), 132
Adenosina fosfosulfato reductasa (APS), 562, 571-73
Adenovirus, 256, 529, 533-34, 836, 882, 995
  genoma, 534
Adherencia, 730-31, 734
  específica, patógeno, 730, 743
  patógenos a sus hospedadores, 91
  virus, 240-42
ADP-ribosilación, 736-37
Adriamicina, 700
Aerobactina, 731, 863
Aeróbica, respiración, 122-23, 568
  ciclo del ácido cítrico, 129-130
  control global, 223
  energética y flujo de carbono, 130
  sistema transportador de electrones, 123-25
Aeróbico, fermentador, 960-63
Aeróbico, tratamiento de aguas residuales, 930-33
Aerobio, 28, 103, 138, 161, 162
  facultativo, 161-62
  estricto, 163
Aeromonas, 354, 805, 944
Aeropyrum, 460
Aerosol, 497
Aerotaxia, 89, 90
Aerotolerante, 138
Afinidad del anticuerpo, 765
Afinidad, inmunoglobulina, 786-87
Aflatoxina, 921
África, enfermedades infecciosas en, 856
Africana, enfermedad del sueño, 479-80
Afta, 832
Agallas del tallo, 675-77
Agammaglobulinemia, 769
Agar, 12, 13, 15, 109, 593
Agar, aislamiento de cultivos axénicos, 611-12
Agar difusión, ensayo de, actividad antibiótica, 697
Agar en sangre, 735-36, 799-800
Agar hierro triple azúcar, 806
Agar intestinal, 799
Agar, técnica de cobertura ensayo de virus, 239
Agarasa, 593
Agaricus, 482
Agaricus bisporus, 982
Agente bactericida, 688
Agente estático, 596
Agente que desgrasa, 669
Agentes de filtración, 970
Agitación, fermentador, 961-62
Aglutinación directa, 818-19
Aglutinación, ensayos, 812
  ensayos con partículas recubiertas, 873-74
  HIV, 903
Aglutinación, pasiva, 819
  de virus, 835
Aglutinación, reacciones de, 797, 816, 818-20
  directa, 818-19
  pasiva, 819
Agmatina, 584
Agretopo, 780
Agricultura,
  antibióticos usados en, 715
  ingeniería genética, 1005
  microbiología, 6-8, 17
Agrobacterium, 289, 337, 354, 675-76
Agrobacteriurn rhizogenes, 675-76
Agrobacteriurn tumefaciens, 675-76, 1005
Agromyces, 415
Agua,
  disolvente biológico, 42-43
  en la fotosíntesis oxigénica, 552-53
  enlaces de puentes de hidrógeno, 39-40
  estructura, 39
  naturaleza cohesiva, 42-43
  para recreo, 934-35
  permeabilidad de las membranas al, 69-70
  polaridad, 40, 42, 43
  potable, 927-28
  sin tratar, 932
  tratada, 933
  tierra primitiva, 323
  vehículo de enfermedad, 847, 854, 928-29, 934-36
    amebiasis, 939-40
    cólera, 925-26
    criptosporidiosis, 937
    fiebre tifoidea, 939
    giardasis, 936-37
    legionela, 938-39
    virus, 939
Aguas residuales, 929
Aguas residuales, microbiología, 927-32
  purificación del agua, 932-33
  salud pública, 927-28
  tratamiento, 929-31
Aguas residuales, tratamiento de, 929-31
  aeróbico,930-33
  anóxico,930-32
  desnitrificación, 930-31
  niveles, 930-32
  primario, 930

  - secundario, 930-32
  - terciario, 931-32
- Aire acondicionado, 699, 938
- Aislamiento, 607
  - cultivo axénico, 611-612
- Alanina,
  - código genético, 195
  - enantiómeros, 50
  - estructura, 49
  - fermentación, 584
  - síntesis, 133
  - D-Alanina, 74, 76, 142
  - L-Alanina, 74
- Alantoína, 584, 682
- *Alcaligenes*, 354, 364, 598
- *Alcaligenes carboxydus*, 364
- *Alcaligenes xylosoxidans*, 365
- Alcalinidad, 158-59
- Alcalófilo, 29, 138, 158, 973
- Alcanoatos, 628
- Alcantarillado, canal, 635
- Alcantarillado, hongos, 387
- Alcantarillado, instalaciones,
  - desnitrificación, 569
  - engrosamiento, 362, 387-88
- Alcantarillado, muestras, pruebas FISH, 516
- Alcohol, 105, *véase* también Etanol
  - antiséptico, 698
  - deshidrogenasa, 105
  - desinfectante, 698
  - esterilizante, 698
- Alcoholes, 584
- Aldehído, 41
- Aldolasa, 120-21,400
- Aldrina, 669
- Ale, 978, 980
- Alergeno, 773
- Alergia, 766, 773, 921
- Algas, 23, 35, 469, 487-90
  - coloniales, 487
  - comunidades endolíticas, 491
  - coralinas, 490
  - ecología, 490-91
  - liquen microfósil, 323
  - marrón-doradas, 488
  - marrones, 486-89
  - motilidad, 490-91
  - nieve, 154
  - paredes celulares, 488-90
  - pigmentos, 488-90
  - polímeros de reserva, 490
  - producción de aceite, 667
  - psicrofílicas, 153-54
  - rojas, 487-90
  - solutos compatibles, 16
  - unicelulares, 487, 489, 523
  - verdes, 487-90
- Algínico, ácido, 490
- *Alicyclobacillus*, 403
- Aliamina, 710
- Alifáticos, hidrocarburos, metabolismo de, 589-90
- Alilamina, 710
- Alimentación animal, antibióticos, 714-15
- Alimentaria, industria, 6, 8
  - aminoácidos, 970
  - preservativa, 290
- Alimentaria, infección, 943, 947
- Alimentaria, intoxicación, 733, 738-39, 777
  - estafilocócico, 947-48
  - por Cl, perfringers, 949-50
- Alimentos,
  - actividad de agua, 159, 943-45
  - altamente perecederos,946-47, 953
  - congelados, 8, 945
  - conservación química, 945-46
  - contenido microbiano, 947
  - destrucción de, 8, 162, 396, 482, 691, 943-44
  - enlatados, 945
  - estables/no perecederos, 943-44
  - esterilización por radiación, 693-94
  - fermentados, 945
  - liofilizados, 945
  - manipulador, 844-45, 951
  - perecederos, 943-44
  - pH, 945
  - preservación, 290, 944-46
  - proceso de enlatado, 945-46
  - salados, 444, 945
  - secos, 8, 945
  - semiperecederos, 943-44
  - sondas nucleicas para microorganismos, 982-83
- Aliso, árbol, 684
- *Allochromatium vinosum*, 355
- *Allochromatium warmingii*, 346-47
- *Allomyces*, 482
- Almacenaje fuel, 667
- Almacenamiento de polímeros, 119, 555, 628
- Almidón, 44, 119, 132, 488-90, 555
- Almidón, hidrólisis, 805
- Alóctona, materia orgánica, 626
- Aloficocianina, 546
- Alosteria, 209
- Alostérico, sitio, 209
- Alquil acetato quinasa, 584
- Alquil acetil-CoA, 584
- 2-Alquil-acetil-fosfato, 584
- 2-Alquil-acetil, 584
- Alquilante, agente, 272
- 3-Alquil-piruvato, 584
- Alta temperatura ambiental, 155-57
- Alta tensión superficial, 43
- Alternaria, 944
- Aluminio, drenaje de minas, 660
- *Alvinella*, 642-43
- *Amanita*, 482, 484
- Amantadina, 709, 884
- Ambiente frío, 153
- Ambientes de agua dulce, 634
- Ambivirus, 246
- Ameba, 479-80
  - anaeróbica, 939
  - hongo mucoso, 486
- Amebiasis, 480, 857, 939-40
- Amebocitos, 740-41
- Ameboide, movimiento, 469, 479-80, 486
- América, enfermedades infecciosas en, 857
- Ames, ensayo de, 275
- Ames, test, 275-76
- Amikacina, 701
- Amilasa, 593-94, 972
  - aplicaciones industriales, 973
  - producción comercial, 972
- Aminoácido, 42, 106
  - D-Aminoácido, 50
  - deshidrogenasa, 143, 517
  - esqueleto carbonado, 132-33
  - estructura, 48, 50
  - excreción, 50
  - familias, 49, 132, 133
  - fermentación, 407, 584-85
  - grupo amino, 133
  - grupo R, 48, 49
  - industria alimentaria, 970
  - L-Aminoácido, 50
  - no polar, 49
  - producción comercial, 210, 970-71
  - regulación y excreción
  - síntesis, 132-33
  - unión a tRNA, 198-99
- Aminoacil-AMP, 199
- Aminoacil-tRNA sintetasa, 168, 197-98, 199
- Aminoglicósido, 688, 700, 706, 958
  - estructura, 707
  - modo de acción, 707
  - resistencia, 712
- Amino-grupo, 48, 133
- 6-Aminopenicilánico, ácido, 705, 967
- Aminopterina, 813
- 2-Aminopurina, 272
- Aminotransferasa, 133
- Amisuero, 763, 771
  - policlonal, 812
- *Ammonifex*, 437
- *Amoeba*, 479-80
- *Amoeba proteus*, 480
- *Amoebobacter purpureus*, 357
- *Amoebobacter*, 356
- Amoniaco,
  - aceptor de electrones, 567
  - anhidro, 655
  - bacterias oxidantes de, 359, 516, 566
  - ciclo del nitrógeno, 654-55
  - de la fijación del nitrógeno, 682
  - efecto desconectado, 602
  - fuente de energía, 130
  - fuente de nitrógeno, 104, 133, 598-99
  - monooxigenasa, 360, 566
  - oxidación, 359, 367, 561, 566-67
  - producción en la desnitrificación, 569-70
  - suelo, 655
  - tierra primitiva, 323
- Amonificación, 655
- Amoxicilina, 887
- *Amphibacillus*, 403
- Ampicilina, 705, 807
- Ampicilina, resistencia, 309
- Amplificación, 833
- *Anabaena*, 418-20
- *Anabaena azollae*, 683-84
- *Anabaena flos-aquae*, 95
- Anabolismo, 103, 131
- *Anaerobacter*, 403
- Anaeróbica, respiración, 130, 448, 540, 568-69, 573-75
  - aceptores de electrones, 579-80
  - control global, 223
  - energética y flujo del carbono, 130
- Anaeróbico, agar, 799
- Anaeróbico, fermentador, 961
- Anaerobio, 28, 103, 138, 162
  - aerotolerante, 138, 162, 399
  - ameba, 939
  - cultivo, 161-62, 802
  - de las profundidades, 633
  - estricto, 162, 165, 415, 458, 568
  - hábitat, 162
  - intestinal, 727
  - rumen, 651
- Anaerobios, jarra de, 802
- *Anaeroplasma*, 409
- Anafiláctico, choque, 774
- Anafilaxia, 773
- Anafilotoxina, 769
- Análisis genómico, 19
- Análisis secuencial, 618
- Anamox, reacción, 540, 566-67
- Anamoxosoma, 567
- Anatomía del diente, 723
- *Ancalochloris*, 429
- *Ancalomicrobium*, 387
- *Ancalomicrobium adetum*, 388
- *Ancyclobacter linguale*, 385
- *Ancyclobacter*, 384-85
- Androgénico, esteroide, 971
- Anemia,
  - falciforme, 918
  - perniciosa, 775
- Anergia, 780
- Anfotericina B, 418
- Anginas, 733, 870
- *Angiococcus*, 392
- Anillo, reducción, 590
- Anillo, rotura, 590
- Animáculos, 9
- Animales con ciego, 654
- Anisomicina, 339
- Anotación, 498
- Anoxia, 540
- Anóxica, componentes aromáticos, 590-91
- Anóxica, descomposición, 582, 645-46-47
- Anóxicas, condiciones, 123, 525
- Anóxico, tratamiento de aguas residuales, 931
- Ansamicina, 700, 961
- Antena, pigmentos, 540, 543-45
- Antibiograma, 797, 808
- Antibiótico, 688, 699, 704, *véase* también compuestos específicos
  - aislamiento y caracterización, 964-65
  - alimentación animal, 714-15
  - amplio espectro, 704-709
  - biofilm, 630
  - búsqueda de nuevos antibióticos, 715-17, 964-66
  - conservación de comida, 946
  - de amplio espectro, 688, 704, 707, 709
  - de espectro reducido, 704
  - efecto en RNA polimerasa, 705
  - efectos sobre la microflora intestinal, 727
  - efectos sobre las mitocondrias y cloroplastos, 474
  - ensayo de dilución, 807
  - ensayos de sensibilidad, 807-809
  - estrecho espectro, 704
  - estructura, 700
  - inhibidor de síntesis de proteínas, 202
  - macrólido, 707
  - modo de acción, 339-40, 701
  - peptídico, 50
  - producción, 404, 417-18, 706
  - producción comercial, 418, 960
  - producción industrial, 967
  - purificación, 966-67
  - semisintético, 704, 705
  - sensibilidad de los tres dominios, 339
  - sensibilidad en disco, 267
  - síntesis de proteína, 704-5
  - uso inapropiado de, 713-15
  - usos en agricultura, 714
  - usos no médicos, 713
- Antibióticos, resistencia,266, 707, 858, *véase* también Plásmidos R
  - contribución a la emergencia de patógenos, 859, 862
  - ensayo de sensibilidad, 807-809
  - genes cromosómicos, 712
  - infecciones nosocomiales, 853
  - mutación seleccionable, 266
  - mutagénesis por transposones, 300-01
  - reversión, 715
  - sobrepaso, 715-17
- Anticodón, 168, 195-97-98, 200
- Anticodón, asa, 198
- Anticuerpo, 748, 757, 780, 784-86, 810 *véase* también Inmunoglobulina
  - activación del complemento, 768
  - antigeno reacción, 767, 816
  - control genético, 766-67
  - detección, 829
  - diversidad, 785
  - ensayo de anticuerpos fluorescentes, *véase* Fluorescente
  - especificidad, 757
  - inmunidad, 763
  - monoclonal *véase* Anticuerpo monoclonal
  - natural, 818
  - producción, 755, 766-67

  respuesta,
    primaria, 748, 767, 810
    secundaria, 748, 767, 811
  técnica para detectar el clon deseado, 991-92
  título, 767, 770-71, 797, 811
Anticuerpos antitumorales, 816
Antígeno, 748, 756, 810, 991
  determinante, 767
  H, 378, 735, 812
  heterólogo, 757
  homólogo, 757
  lugar de unión en inmunoglobulina, 764-65
  O, 378, 734, 812
  protector (PA), 733
  superantígeno, 773, 776-77
  T, 530
  tumoral, 816
Antígenos propios, 790
Antígenos tumorales específicos de superficie celular, 748, 751-52, 757-58-59, 762-63, 782, 792
Antimicrobiano, agente, 688, 696 *véase* también Antibiótico
  efecto sobre el crecimiento, 696
  medida de actividad antimicrobiana, 696-97
  sintético, 699-703
  toxicidad selectiva, 696
Antiparalelo, 168
Antiportador, 71-2
Antisentido, ácido nucleico, 225
Antisentido, RNA, 225
Antiséptico, 688, 697-98
Antiterminadora, proteína del bacteriófago lambda 252
Antitoxina, 771, 817
a-1-Antitripsina, 1008
Antivíricos, fármacos, 882
Antraciclina, 700, 960
Ántrax, 12, 704, 733, 741, 843, 856, 860, 864, 875, 1009
  vacuna, 771
Apareamiento interrumpido, 294-99
Apicomplexa, 479, 481
Apocrina, glándula, 722
Apoptosis, 760, 780, 789
APS quinasa, 572
APS reductasa, 562, 571-72-73
APS, *véase* Adenosín fosfosulfato
Aquachelina, 105-6
Aquaporina, 70
Aquaspirillum, 354, 383-84
Aquaspirillum autotrophicum, 365
Aquaspirillum serpens, 78
Aquifex, 32, 33, 336, 353, 438, 465, 557
Aquifex aeolicus, 439
Aquifex pyrophilus, 365, 437-38
Arabidopsis, 504
Arabidopsis thaliana, 504-5
Arachnia, 415
Arbol filogenético, 4, 26-27, 336, 618
  de secuencias rRNA, 332-33
  univesal, 335-6
Arbuscular mycorrhizae, 673
Archaea, 22, 23, 27, 322, 335
  acidófilo, 158
  árbol filogenético, 27, 33
  carencia de pared celular, 451-52
  diversidad, 32-34
  evolución, 26, 27, 465-66
  filogenia, 336-37, 442-43
  halófilos extremos, 453-56
  hipertermófilos, 453-63
  lípidos, 338, 340
  membrana citoplasmática, 68, 69
  metabolismo energético, 443-44
  metanógenos, 448-49
  pared celular, 79, 338
  propiedades fenotípicas, 338-40
  RNA polimerasa, 190, 338-39-40
  secuencia firma, 334
  sensibilidad a antibióticos, 339
  síntesis de proteínas, 339-40
  termofílicas, 157
Archaeoglobus, 396, 437-38, 458-59
Archaeoglobus fulgidus, 455
  genoma, 499
Archangium, 392
Área costera, 637
Arenavirus, 256
Arginina,
  cianoficina, 420
  código genético, 195
  dihidrolasa, 420
  estructura, 49
  fermentación, 584
  regulón, 218
  represor, 216
  síntesis, 133, 209, 215
2-Aril-acetil-CoA, 584
2-Aril-acetil-fosfato, 584
3-Aril-piruvato, 584
Arizona, 377, 804
Armamento biológico, 839, 864
Armas biológicas, 864
  candidato, 864
  características, 864
  exposición, 865
  prevención y respuesta, 865
Arsenato, 580-81
Arsenato, resistencia a, 666
Arsénico, 663-64
Arsénico compuesto, donador de electrones, 581
Arteria, 749, 751
Arthrobacter, 365, 411, 415
Arthrobacter crystallopoietes, 75, 411
Arthrobacter globiformis, 412
Arthrospira, 418-19
Artificial, inmunidad activa, 769-70
Artificial, inmunidad pasiva, 770
Artritis, 399, 885
Artritis sinovial, 424
Artrópodo, vector, 846, 859
Ascomiceto, 380, 475
Ascomycetes, 482-83
Ascórbico, ácido, producción comercial, 372, 975
Ascospora, 380, 482-83
Aséptica, técnica, 103, 109-10
Ashbya gossypii, 970
Asiática, gripe, 884
Asimilativo, metabolismo, 495
Asparragina, 682
  código genético, 195
  estructura, 49
  síntesis, 132
Aspartamo, 970
Aspartato,
  estructura, 49
  fermentación, 584
  síntesis de pirimidinas, 134
  síntesis de purinas, 134
  síntesis, 133
Aspartoquinasa, 970-71
Aspergillus, 482-83, 944, 967
Aspergillus flavus, 921
Aspergillus fumigatus, 484
Aspergillus niger, 963, 974-75
Aspergilluss nidulans, 267
Asteroleplasma, 409
Asticcacaulis, 387
Asticcacaulis biprosthecum, 388
Astrovirus, 955
Atenuación, 207, 220-22, 720
Atenuación traduccional, 222
Atenuador, 221
Atleta, pie de, 482-83, 922
Atmósfera,
  acumulación de oxígeno, 327-28, 338
  tierra antigua, 323
ATP, *véase* también mitocondrias 28, 46, 118-19
  bacterias del azufre, 562
  bacterias nitrificantes, 565-66
  bacterias que oxidan hidrógeno, 559
  bacterias que oxidan hierro, 564
  bacterias reductoras de sulfato, 571-73
  células primitivas, 327
  descarboxilación de ácidos orgánicos, 585-87
  energía libre de hidrólisis, 118-19
  estructura, 47, 118
  fermentación, 119, 123, 582-83
  fosforilación oxidativa, 128
  fotosíntesis, 541, 548-52
  fotosíntesis oxigénica, 522-55
  fuerza motriz de protones, 128
  halófilos extremos, 448-49
  homoacetógenos, 573-74
  metanógenos, 450, 573-74, 578-79
  producción,
  respiración, 123
  sintetasa, 103, 120, 128, 506, 550, 586, 592
  sintrofia, 588
  sistema transportador de electrones, 123, 125-28
  sulfurilasa, 571
  uso,
    activación de aminoácidos, 199
    biosíntesis, 131
    ciclo de Calvin, 555-56
    fijación de nitrógeno, 601
    glicolisis, 120
    plegamiento de proteínas, 203
ATPasa, *véase* ATP sintetasa
Atrayente, 87, 88, 227-28
Atrazina,668-69
att, sitio, 254, 285
attR, sitio, 520
Aureobasidium pollulans, 672
Aureomicina, *véase* Clortetraciclina
Autoanticuerpo, 748, 775,-76, 790
Autoclave, 109, 688-90-91
Autoensamblaje, virus, 234
Autofluorescencia, 60, 577
Autofosforilación, 226
Autoinducción, 380
Autoinmune, enfermedad, 773, 776, 815, 871
Autolisina, 140-41, 279
Autolisis, 138, 141
Autotrofia, 540
Autotrofo, 17, 28, 103-04, 131, 499, 541, 573
  anoxigénica,fotosíntesis, 551-52
  Archaea, 444
  evolución, 327
  fijación de dióxido de carbono, 555-57
  quimiolitotrófico, 561
Auxotrofo, 265-66-67-69
Avery, Oswald, 18, 280
Aviar, clamidiasis, 424
Avidez, inmunoglobulina, 766
Azidotimidina (AZT), 708, 900-901
Azitromicina, 892, 893
Azol, 710
Azolla, 421, 683-84
Azolla pinnata, 691
Azomonas, 373, 598
Azorhizobium, 598, 677
Azorhizobium caulinodans, 678, 682
Azospirillum, 354, 372-73, 383-84
Azospirillum lipoferum, 384, 598, 684
Azotobacter, 30, 283, 354, 372-74, 598, 607-10, 655
Azotobacter chroococcum, 374
Azotobacter vinelandii, 373, 601
AZT, *véase* Azidotimidina
Azúcar, 42
  fosforilado, 72
  metabolismo, 132
Azúcares, 160-61, 593, 595, 724
Azufre,
  aceptor de electrones, 461
  balance global, 657
  componentes orgánicos, 657-58
  desproporción, 656
  estudios de fraccionamiento de isótopos, 621-22
  gránulo, 92, 552, 561
  oxidación, 456-57, 560-63, 626
  oxidación a sulfato, 560
  requerimientos celulares, 104
Babosa, 487
Bacilar, disentería, 378
Bacillus acidocaldarius, 404,
Bacillus anthracis, 12, 92, 404, 704, 733, 821, 843, 860, 863-64, 875, 1009
Bacillus cereus, 59, 404, 614, 618, 733, 738-40, 948, 954
Bacillus circularas, 404
Bacillus coagulans, 404
Bacillus larvae,404
Bacillus licheniformis, 404, 964, 973
Bacillus macerans, 404
Bacillus megaterium, 98, 232, 334, 404, 618, 752
Bacillus pasteurii, 404
Bacillus polymyxa, 404, 598, 608, 964
Bacillus popilliae, 404
Bacillus schlegelii, 364-65
Bacillus sphaericus, 404
Bacillus stearothermophilus, 404
Bacillus subtilis, 63, 75, 77, 178, 189, 222, 279, 290, 302, 404, 499, 594, 618
  esporulación, 98
  genoma, 499
  hospedador clónico, 989
  parálogo, 502
Bacillus thuringiensis, 404-5, 1006-7
Bacilos, 10, 30-1, 65, 98, 158, 222, 283, 404, 609, 618, 655, 704, 804, 944
  esporulación, 226
Bacitracina, 404, 700, 964
Bacteremia, 720, 732, 797-98
Bacteria (Dominio), 6, 22, 23, 27, 322, 335
  árbol filogenético, 27, 30
  biomasa, 6
  clases de ácidos grasos, 345
  diversidad, 29-32
  evolución, 26-27
  filogenia, 336-37, 353-54
  lípidos, 338, 340
  pared celular, 338
  propiedades fenotípicas, 338-40
  RNA polimerasa, 338-39, 340
  secuencia signatura, 334
  sensibilidad a antibióticos, 339
  síntesis de proteínas, 339-40
Bacteria del ácido acético, 371-72
  suboxidante, 372
Bacteria roja, 542-47, *véase* también Proteobacteria
  aparato fotosintético, 548-50
  del azufre, 355-57
  grupo gamma, 373
  no del azufre, 608
Bacteria verdes, 352
Bacteria verdes del azufre, 31, 32, 336, 353, 436-37, 544, 547
  características, 429
  colonias, 428-29
  composición isotópica del carbono, 622
  cultivo enriquecido, 608
  ecología, 428
  pigmentos, 428-29
Bacteria verdes no del azufre, 31, 32, 336, 353, 436-37, 544, 547
Bacteriana, citología, 19
Bacteriana, genética, 19

Bacterias con apéndices, 64, 388, 427
Bacterias con pedúnculos, 388-89, 390-91,
  Plantomyces, 425-26
Bacterias del azufre, 559
  energética, 562
  metabolismo del carbono, 566
  sin color, 560
Bacterias del hierro, 559
Bacterias incoloras del azufre, 560
Bacterias oxidadoras de sulfuro, 640
Bacterias oxidantes de metano, 360
Bacterias oxidantes del azufre, 360-63
  características, 361
Bacterias reductoras de sulfato, 352, 388-89, 571-72, 610, 612, 626, 636, 647
  aislamiento, 397
  autotróficas, 575
  bioquímica, 571-72
  características, 396
  ciclo del azufre, 656-57
  desproporcionado, 572-73
  energética, 571-72
  fisiología, 397
  fraccionamiento de isótopos del azufre, 622
  océanos, 649-50
  oxidantes de acetato, 397, 572
  oxidantes no acéticos, 397
  transformaciones de mercurio, 665
Bacteriocina, 290
Bacterioclorofila, 429, 540, 542-43
Bacterioclorofila a, 90, 429, 436, 542-43-44, 549, 683
Bacterioclorofila c, 429, 544
Bacterioclorofila c$_s$, 544
Bacterioclorofila d, 429, 544
Bacterioclorofila e, 429, 544
Bacterioclorofila g, 544
Bacteriófago, 19, 232, 513
  atemperado, 250-55
  colaborador, 285
  como sistema modelo, 246
  conversión fágica, 286
  DNA bicatenario, 518-20
  ensayo en placa, 238-39
  específicos de machos, 291
  factores de virulencia, 863
  ingeniería genética, 246
  monocatenarios filamentosos con DNA, 517-18
  monocatenarios icosaédricos con DNA, 517-18
  transductor, 283-86
  transponible, 520-22
  virulento, 247-50
β Bacteriófago, 286, 736, 873
ϕX174 bacteriófago, 234, 247
  genoma, 494, 515
  mapa genético, 516
  multiplicación, 515-16
  transcripción y traslación, 516
Bacteriofeofitina, 549-50
Bacteriolítico, agente, 696
Bacterionema, 415
Bacteriorrodopsina, 442, 447-48, 637
Bacterioruberina, 447
Bacteriostático, agente, 688, 696
Bacterófago específico de macho, 291
Bacteroide, 625, 679-80, 682-83
Bacteroides, 427, 586, 721, 726-27, 800
Bactoprenol, 141
Bacturia, 80-8
Baculovirus, 993
Balance de agua positivo, 159
Balantidium, 479
Balantidium coli, 481
«Bala mágica»,699, 702
Ball, 302
Baltimore David, 18, 244
Banda menos (neativa) del ácido nucleico, 232, 244-45, 513
Barótilo, 29, 625, 638-39
  extreme 639
Barotolerancia, 625, 638-40
Basalt, cuerpo, flagelo, 83, 479
Basalto, 633
Base, análogo, 271-72
Bases nitrogenadas, 46
Básica, fucsina, 412
Basidio, 483
Basidiomicetos, 482-83
Basidiospora, 482-83
Bateriófago atemperado, 250-55
  ciclo de vida, 251
Bazo, 749, 767, 790-91
Bch genes, 551
Bdelloribrio, 354, 384-86
Bdellovibrio bacteriovorus, 386
Bdeloplasto, 385-86
Beadle George, 18
Bebida destilada, 123, 958, 978, 900-91
Bebidas alcohólicas, 8, 371, 943, 976, 978-83
Beggiatoa, 361-62, 561-62, 641, 656
Behring Emil von, 18
Beijcrinck, Martinus, 16, 18, 372, 384, 522, 607
Beijerinckia, 354, 373, 598
Beijerinckia indica, 374
Benceno, 590-91
Benceno epóxido, 591
Benceno monooxigenasa, 591
Bencenodiol, 591
Benzilpenicilina, *véase* Penicilina G
Benzoato, 581, 590-91
  donador de electrones, 582
  fermentación, 648
Benzoil CoA, 590-91
Benzoquinona, 700
Bergey's Manual, 349
Bernson, Solomon, 18
Beta-oxidación, 597
  acetato, 648
B-horizonte, 631
Bifidobacterium, 415, 721, 726
Biliares, ácidos, 727
Bimolécula lineal 520
Binario, vector, 1005
Binomial, sistema, 322, 348
bio operon, 254
Biocatálisis, 958
Bioconversión, 372, 958, 971-72
Biodegradación,
  polímeros sintéticos, 670-71
  xenobiótica, 668-69
Biodisponibilidad, 669
Biodiversidad, 607, 627
  cuantificación de organismos, medición de la actividad ruicrobiana, 615-19
  establecimiento a través del enriquecimiento y aislamiento, 607
Bioenergética, 110-11
Biofilmes, 625, 628-30, 699
  consecuencias y control, 629
  estructura, 628
Biofuel, 6, 8
Biogeoquímica, 625
Biogeoquímico, ciclo, 626
Bioinformática, 492
Biolixiviación, 6
Biológica, cabina de seguridad, 692
Bioluminescencia, 380-81
  regulación, 224
Biomasa, combustible, 649
Biomasa, producción, 8
Biomineralización, 581
Biomoléculas, modelos de unión, 41
Biopsia, 795
Bioquímica microbiana, 19
Biorreactor, 664, 930
Biorremediación, 6, 8, 581, 632, 666
Biosíntesis,
  ciclo ácido cítrico, 129-30
  crecimiento y, 134
Biosintética, capacidad y requerimientos nutricionales, 107-8
Biosintética, penicilina, 958, 967-69
Biota normal, 720-21
Biotecnología, 2, 6, 8, 19, 966, 995 *véase* también Ingeniería Genética Microbiana
  de plantas, 676, 1006
  usos de termófilos, 157
Biotina, 106
Biotransformación, *véase* también Bioconversión
Bisulfito, 946
Bisulfuro, 658
Blastobacter, 387
Blastomicosis, 775, 832, 922
Blastomyces desmatitidis, 832, 922
Bleomicina, 700
Bootstrapping, 333
Bordet, J.,875
Bordetella, 354
Bordetella pertussis, 733, 772, 843, 863, 869, 873-75, 875
Borrelia burgdorferi, 105, 177-79, 435, 812, 827, 844, 859, 912-13
  genoma, 499-501
  plásmido, 287
Borrelia, 433-35, 723, 744
Borrelia garinii, 913
Borrelia recurrentis, 434
Botrycoccus braunii, 667
Botrytis, 944
Botulismo, 407, 733, 737, 743, 840, 843, 856, 875, 943, 949-50
  incidencia en Estados Unidos, 950
  infantil, 742, 950
Bouquet (vino), 980
Bovina somatotropina, 1004
Bovina tuberculosis, 842, 854, 877
Boyer, Herbert, 18
Brachyspira, 433
Bradyrhizobium, 354, 598, 677-78
Bradyrhizobium elkanii, 678
Bradyrhizobium japonicum, 678
Brandy, 976, 978, 980, 981
Branhamella, 374, 800
Brenner, Sydney, 18
Brevibacterium, 415
Brevibacterium albidum, 302
Brevibacterium flavum, 970-71
Brevinema, 433
Brocadia anammoxidans, 567
Brock, Thomas, 18, 438, 460
Bromometano, 366
Bromoperoxidasa, 105
5-Bromouracilo, 272, 703
Brucella, 179, 354, 812, 825
Brucella abortus 731, 743, 864
Brucella melitensis, 843
Brucelosis 775, 811, 843, 854, 856
BsuRI, 302
Bt-toxina, 405, 1006
Bubón, 919-20
Bubónica, peste, 919
Bucle cruciforme, 173
  DNA, 173
  mRNA, 221-22
  RNA, 173, 191, 221-22
Bunyaviridae, 908
Bunyavirus, 256, 825, 845-46
Burkholderia, 354, 368
Burkholderia cepacia, 369-371, 670
Burkholderia mallei, 370-71
Burkholderia pseudomallei, 370-71
Burnet, B. Macfarlane, 1
2,3 Butanodiol, fermentación, 376, 379, 585
Butanol, 406, 585
Butiraldehído 406
Butirato, 727
  producción en el rumen, 651-52-53
  producto de fermentación, 406-7, 584-85, 587, 646-47
  quinasa, 584
Butiril-COA, 406, 583-84
Butirilfosfato, 583-84
Butyrivibrio, 415
Butyrivibrio fibrisolvens, 653

C gen, 785
Caballo, digestión, 654
Cabeza, virión 242
Cadaverina, 407
Cadena ligera de las inmunoglobulinas, 784-85
  gen, 785
  región constante, 764-65
  región variable, 764-65
Cadena pesada, gen, 785
Cadena pesada, inmunoglobulina, 764, 784-85
  dominio constante, 764-65
  dominio variable, 764-66
Cadenas ligeras de IgG, 764
  dominos variables, 764
  dominios constantes, 764
Cadmio, 664
Cadmio, resistencia, 666
Caenorhabditis elegans, 504
Cálcico, dipicolinato, 96, 98
Cálcico, propionato, 946
Calcio, 104
Calciviridae, 849-50
Calcocita, 662
Caldivirga, 459
Calidad del agua, 927-29
Callo (planta), 675
Calothra, 418
Calvin, ciclo, 361, 444, 473, 540, 555, 557, 560, 641
  enzimas de, 555
  sulfuro *Bacteria*, 562
Cámaras anóxicas, 163
Cámaras de recuento, 145-46
Cambio antigénico, 528
cAMP, *véase* AMP cíclico
Campo oscuro, microscopio, 57, 59
Campylobacter, 354, 384, 386-87, 396, 581, 819, 832, 886, 944, 953
Campylobacter coli, 953
Campylobacter jejuni, 860, 946, 948, 953
Cáncer, 256
  de piel, 257
  ensayos con anticuerpos fluorescentes, 821-22
  pruebas de ácido nucleico, 834
  tratamiento con anticuerpos monoclonales, 825-27
  virus y, 256-58
Candicidina, 700, 961
Candida, 482, 711, 721-22, 729, 827, 832, 853, 861, 944, 981
Candida albicans, 484, 727, 805, 812, 819, 853, 890, 897, 922
  genoma, 504
Candidiasis, 832, 861, 922
CAP (=PAC; proteína activada por catabolito)
CAP, lugar de unión a, Capa S, 220
Capa viscosa, 720, 730
Capilares, estudios de quimiotaxis, 88, 89
Capnocytophaga, 725
Capping del mRNA, 193, 255, 340
Caproato, 407
  producción en el rumen, 653
  producto por fermentación, 585
Cápsida virus, 234, 535, 537
Capsómero, 234
Cápsula, 91, 92, 720, 730, 754, 872

Captura, sonda, 834
Carbamil fosfato, 421, 583-84
Carbamil fosfato quinasa, 584
Carbenicilina, 705-706
Carbohidrato, *véase también* Polisacárido
  estructura, 43, 44
  modelos de fermentación 804
Carbonato, 130, 568
Carbónica, anhidrasa, 105
Carbono,
  en la naturaleza, 104
  en las células, 41, 104
  nutriente, 28
Carbono, ciclo, 644-46
  en rumiantes, 650-54
Carbono, fuente de, 104
  células primitivas, 327
  cultivo medio, 104
Carbono, polímeros de reserva de, 92
Carboxidotróficas, bacterias 364
Carboxílico, ácido, 41
Carboxisoma, 352, 555-56, 820
Carbunco, 731
Carcinogénesis,
  iniciación, 257
  mutagénesis y 275-76,
  promoción, 257
Carcinógeno, 256
  test de Ames, 275-76
Cardinales, temperaturas, 138, 151-52
Carditis, 885
Carotenoide, 164, 354, 395, 413, 422, 428-30, 447, 540, 543, 545-47, 550-51, 753
  estructura, 547
α-Caroteno,422
β-Caroteno,y 422, 546-47
γ caroteno, 547
Casette, mecanismo de conjugación en levaduras, 475-76
Casette, mutagénesis, 314
Caso esporádico, 840
Casuarina, 598
cat gen, 594
Catabólica, represión,219-20
Catabolismo, 103, 131
Catalasa, 105, 164, 165, 403, 471
Catalasa, ensayo, 804
Catálisis, 111, 112-13
Catalítico, anticuerpo, 787
Catarata del ratón lactante, 410
Catecol 2, 3-dioxigenasa, 591
Catecol dioxigenasa, 591
Caulobacter crescentus, 598
Caulobacter, 159, 354, 387, 391
Cavalli-Sforza, 281
cDNA, *véase* DNA complementario
Ceanothus, 598
Cefalosporina, 701, 705, 968
  estructura, 706
  mecanismos de acción, 706
  producción comercial, 964
Cefalotina, 807
Cefamicina, 705
Cefoxitina, 807
Ceftriaxona, 700, 706, 713, 894, 913
Cellulomonas, 415
Celubiosa, 595, 646
Célula, 2, 3
  características, 3, 4
  citoesqueleto, 475
  como instrumento codificador, 3, 4, 6
  como máquina química, 3, 4, 6
  composición química, 3
  diana, 759
  forma, 63-64, 74
    en procariotas, 140
  inmovilizada, 973-74
  origen, 465
  primitiva,
    energética, 326-27
    estructura, 22-23
    fuente de carbono, 327
    proteínas catalíticas, 326
  sistema abierto, 3
  tamaño, 23, 64-65, 409
  tumoral, activación del macrófago, 762
Celular, crecimiento, *véase* Crecimiento
Celular, cultivo,
  ensayo de virus, 835
  hospedador de virus237-38
  líneas celulares permanentes, 238
  líneas celulares primarias, 238
Celular, densidad, quimiostato, 150
Celular, división,
  bacterias gemantes y apendiculadas, 388
  Caulobacter, 391
Celular, inclusión, *véase* Inclusión
Celular, inmunidad, 748, 755, 761-62, 774, 775, 810
Celular, lisis, *véase* Lisis
Celular, membrana, *véase* Membrana citoplasmática
Células B, 748, 750, 755
  actiación, 762-3
  anticuerpos monoclonales, 812-16
  interacciones célula T-célula B, 766
  producción de anticuerpos, 766-7
  tolerancia inmune, 790
Células hijas, 139
Células T, 748, 750, 755-56, 810-11
  activación, 791-92
  autorreactivas, 789-91
  CD4, 760, 769, 822, 897-99
  CD8, 760, 822-23
  citotóxicas, 760-61, 781-82, 810
  cooperadoras, 90, 761-62, 769, 782, 810, 823, 897-98
  naive, 792
  presentación antígeno, 768-69
  reconocer antígenos extraños, 759
  selección negativa, 780
  selección positiva, 780
  tolerancia, 780, 789-90
  HVI infección, 897-98
Células, pedúnculos, 487
Celulolíticas, bacterias, 646
Celulosa, 44, 45, 338, 593, 650-51, 972-73
  acetato, 670
  degradación de, 427, 483, 593-95, 646-47, 654
  producción bacteriana, 372
Centro de reacción, 540, 543-45, 551-554
Centrómero, 177, 497
Cepa atenuada, 732, 770, 779
Cepa tipo, 348
Cephalosporium, 705, 964
Cephalosporium achremonium, 968
Cerebrósidos, 427
Cerveza 123, 371, 976, 978, 980, 981
Cerveza, casera, 982-83
Cervical, cáncer, 257, 832, 834, 895
Cervicitis, 424
3-Ceto-acil-CoA, 584
2-Ceto-butirato, 592
α-cetoglutarato, 106, 129, 133, 557-8
Chagas, enfermedad de, 827, 856
Chainia, 415
Chamaesiphon, 418
Chancro, 892-93
Chancroide, 856, 890
Chang, Annie, 18
Chaperón (chaperonina, *véase* Proteína acompañante)
Chaperón, 203, 223, 463
Chaperones moleculares, 168, 203, 223, 234, 262, 999
Charon,fagos, 310, 492
Che genes, 501
Chimenea hidrotermal, 642-43
Chimenea, respiradero hidrotermal, 465, 642-43
Chlamydia, 31, 353, 423-25, 841, 844
  características, 424
  ciclo de vida, 424-25
  ciclo infeccioso, 425-26
  propiedas moleculares y metabólicas, 423-24
Chlamydia pneumoniae, 423-24
Chlamydia psittaci, 423-24, 844, 869
Chlamydia trachomatis, 422-23, 800, 832, 834, 844, 856, 860, 890, 892-94
Chlamydomonas, 543
Chlamydomonas nivalis, 154
Chlorella virus, 523
Chlorella vulgaris, 505
Chlorobium, 32, 429, 556, 598
Chlorobium limicola, 429, 552, 610
Chlorobium phaeobacteroides, 430
Chlorobium tepidum, 430
Chloroflexus, 31-32, 353, 436-37, 543, 547, 553, 557, 621
Chloroflexus aurantiacus, 64, 437
Chlorogloeopsis fritschii, 820
Chlorogloeopsis, 418
Chloroherpeton, 429
Chloronema, 437
Chlorophyta, 488-490
Chondromyces, 392
Choque séptico, 744, 798-99
Chromatium, 17, 30, 354, 356, 361, 565, 598
Chromatium okenii, 357, 552, 610
Chromobacterium, 354, 375
Chromobacterium violaceum, 375
Chroococcidiopsis, 418, 491
Chrysophyta, 488
Cianobacterias, 2, 30, 31, 336, 352, 418-20, 487
  carbón isotópico, composición, 622
  cianoficina, 420-21
  clasificación, colonial, 418-19
  cultivo de enriquecimiento, 608
  ecología, 421-22
  endofita, 491
  estructura, 418-19-20
  fijación de nitrógeno, 420, 683
  filamentosas, 418-19
  filamentosas ramificadas, 418-19
  fisiología, 421
  géneros y grupos, 418
  heterocistos, 420
  líquenes, *véase* Liquen
  neurotoxina, 421
  solutos compatibles, 161
  unicelular, 420
  vesículas de gas, 94, 420
Cianógeno, bromuro, 1001
Cianuro, 128, 601, 603
Cicatriz de gemación, 485
Cíclica, enfermedad, 850
Cíclica, fotofosforilación, 540, 550, 554
Cíclica, lactona, antibiótico, 700
Cíclico, AMP (cAMP),
  agregación de hongos mucosos, 486-87
  estructura, 219
  pertusis, 873-75
  represión catabólica, 219-20
  toxina colérica, 758-59
Cíclico, AMP, proteína que lo une, 218
Cíclico, difosfoglicerato, 454, 464
Ciclo de la vida,
  Caulobacter, 392
  celular, 4
  Chlamydia, 424-25
  Hyphomicrobium, 389
  mixobacterias,cuerpos fructíferos de, 392-93
Ciclo del azufre, 656-57
Cicloalcano, derivado, 700
Cicloheximida, 339, 704
  estructura, 700
  modo de acción, 202
  producción comercial, 964
Cicloserina, 700, 964
Cidofovir, 709
Ciego, 654
Cigoespora, 482-483
Ciliados, 336, 469, 480-81
  depredador, 480
  endosimbiontes de, 481
  rumen, 481, 652
Ciliophora, 479
Cilios, 480, 743
Ciprofloxacina, 176, 700, 704
Circulatorio, sistema, 749-50-51
Circulina, 404
Cirrosis, 868, 887, 889
Cisteína, 52
  código genético, 195
  estructura, 49
Cistos,
  Azotobacter, 373
  Entamoeba, 939-40
  Giardia, 936-37
  mixobacterias, 395
Citocromo, 123-24, 127, 550-51, 552
Citocromo a, 446
Citocromo a$_1$ 126, 566
Citocromo aa$_3$, 564
Citocromo b, 450, 579, 582
Citocromo bc$_1$ complejo, 125, 127, 549-50
Citocromo b$_f$ 554
Citocromo c oxidase, 507
Citoesqueleto, 23, 469, 475
Citología, bacteriana, 19
Citomegalovirus, 709, 832, 896
Citomegalovirus humano, 232
Citoplasma, 1, 22-23
  halófico, 447
Citoplasmática, membrana, 2, 22, 23, 56, 81
  acidófilo estricto, 158
  Archaea, 68, 69
  área de superficie, 65
  barófilos, 639
  barrera selectiva, 66
  composición química, 66
  daño por el complemento, 767-69
  esteroles y hopanoides, 68
  estructura, 66-69
  fluidez, 67, 152
  función, 69, 71
  micoplasma, 409
  mosaico fluido, 67
  permeabilidad selectiva, 69, 70
  psicrófilo, 155
  rigidez, 68
  transporte, 69-70
Citosina, 40, 46, 47, 48, 171-72
Citotoxina, 733-35
Citrato, 129
  ácido, ciclo del, 103, 129-30, 581
  modificado para oxidación de acetato, 572
  metabolismo de ácidos orgánicos, 595
  reverso, 429, 438, 444, 556-57
  fermentación, 584, 586
  metabolismo, 595-96
  sintasa, 557
Cítricos exocortis, viroide, 261
Citrobacter, 301, 377-78, 804

Citrobacter freundii, 598
Cladosporium, 944
Clarificador, 933
Clases (taxonomía), 346-47
Clasificación, 348-49
  cianobacterias, 418-19
  espiroquetas, 432
  metanotrofos, 366-67
  virus animales, 255-56
Clindamicina, 418, 701, 807
Clínica, microbiología, 797
Clofacimina, 877
Clonación, 307-8
  aislamiento y fragmentación del DNA, 307
  búsqueda del clon deseado, 990-993
  detección por anticuerpos frente proteínas, 991-992
  en plantas, 1005
  gen clonado expresado en hospedador, 991
  genes de mamíferos en bacterias, 996-1000
  hospedador, 307, 989-90
    eucariótico, 990
    gen expresado en, 991
    procariótico, 985
  toxicidad de proteínas, 999
  insulina humana, 1000-1001
  mapas genómicos, 497
  molecular, 265, 620, 987-88
  pasos, 307-8
  por shot-gun, 265, 308, 497-98
  sonda de ácido nucleico, 992
  transferido del DNA al hospedador, 307-8
  unión de fragmentos al vector de clonación, 307
Clonación, vector, 265, 306-07, 494-96
  bacteriófago lambda, 310-11, 494
  bacteriófago M 13, 494
  binaria, 1005
  cósmido, 311
  cromosomas humanos artificiales, 496-97
  en plantas, 1005
  para secuencia de DNA, 496
  plásmidos, 308-9
  retrovirus, 366
  vector de expresión, 987, 993-94
Clonal, anergia, 790, 791-92
  delección, 780, 790
  parálisis, *véase* Clonal, anergia selección
Cloramina, 934
Cloranfenicol, 339, 700, 704, 807, 878, 910
  modo de acción, 202
  producción, 418
  producción comercial, 964
  resistencia, 711-12
  síntesis, 961
Clorato, 579-80
Clorato-reductor *Bacteria*, 580
Clordane, 668
Cloro, 928
  purificación del agua, 933-34
Cloro, compuestos de, 698
Clorobacteno, 546
3-Clorobenzoato,581
Clorochromatium aggregatum, 430-31
Clorofenol, 582
Clorofila, 473, 487, 488, 540, 541, 542-43
  a, 418, 422, 488, 542-43, 546, 552, 636
  antenas, 543
  b, 422-23, 488, 542, 636
  c, 488
  centro de reacción, 543-44
  d, 422-23
  e, 488
  espectro de absorción, 542
  estructura, 542-43
Cloroformo, 669
Clorometano, 366
Cloroplasto, 23, 35, 469, 472-73, 487-88, 542-43, 553
  DNA, 177, 179, 473-74
  efecto de antibióticos, 474
  estructura, 473
  evolución, 328-29, 336, 422-23, 474
  genoma, 505
  mitocondria, 471, 472
  ribosoma, 474
Cloroquina, 916
Clorosoma, 352, 429, 540, 543, 549
Clortetraciclina, 418, 707, 968
Cloruro, 70
Clostridium, 162, 289, 403, 574, 585, 598, 609, 618, 655, 704, 721, 726, 800, 804, 840, 849, 944
Clostridium aceticum, 97, 405, 574, 585
Clostridium acetobutylicum, 405, 585
Clostridium acidi-urici, 405, 585
Clostridium bifermentans, 403, 405
Clostridium botulinum, 405, 407, 693, 733, 737, 742-43, 843, 863-64, 875, 924, 947, 949-50
Clostridium butyricum, 405, 585
Clostridium cadaveris, 403
Clostridium cellobioparum, 405
Clostridium chauveri, 821
Clostridium difficile, 924
Clostridium formicoaceticum, 405, 574
Clostridium histolyticum, 618
Clostridium kluyveri, 405, 585
Clostridium lochheadii, 653
Clostridium methylpentosum, 405
Clostridium pascui, 98
Clostridium pasteurianum, 405, 406, 601, 609
Clostridium perfringens, 405, 407, 596, 733, 735, 736, 738, 739, 802, 875, 948, 949
Clostridium propionicum, 405, 585
Clostridium purinolyticum, 585
Clostridium septicum, 821
Clostridium sporogenes, 403, 405, 407
Clostridium tetani, 405, 407, 693, 732-33, 737-38, 743, 770, 802, 842, 875, 923-24
Clostridium tetanomorphum, 405, 609
Clostridium thermoaceticum, 405, 574
Clostridium thermocellum, 405
Clostridium thermosulfurogenes, 405
Clotrimazol, 710
CoA transferasa, 411
Coagulación, 933
  factores, 933
Coagulasa, 289, 733, 735, 863, 885-87
Coagulasa, ensayo, 804
Cobalamina, *véase* Vitamina B12
Cobalto, 105, 578, 664
Cobalto, resistencia, 666
Cobre, 105, 664
Cobre, minas de, 660
Cobre, sulfato, 698
Coccidioides immitis, 832, 869, 922-23
Coccidioidomicosis, 775, 832, 922-23
Coccidios, 481
Cocidiomicosis, 856
Coco, 64
Cocobacilo, 374
Codón, 168-69, 194-96, 197-98, 200
  contexto, 197
  de lectura, 196, 339
  iniciación, 196, 339
  terminación (parada), 195-96-97, 201, 270
  uso, 197, 995, 999
Codones de parada, 195-96, 201, 270
Coenzima, 103, 105, 113, 117
Coenzima A, 119, 129
Coenzima B, (CoB), 576-77
Coenzima F_{420}, 455, 576-77
Coenzima F_{430}, 576-77
Coenzima M, 455, 576-77
Coenzima Q, 125, 127
Coevolución, hospedador y parásito, 848-49
Cohen, Stanley, 18
Cohn, Ferdinand, 9, 10, 11, 18, 30
Cointegrado, 300
Col ácida, 8, 945
Col plásmido, 290
Colagenasa, 733, 735
Cólera, 12, 380, 630, 733, 743, 843, 847, 855, 856, 860, 862, 875, 935-36
  ave de corral, 12
  biología, 935
  diagnóstico, 936
  enterotoxina, 936
  epidemiología, 935-36
  patogénesis, 936
  tratamiento, 936
  vacuna del, 771, 858
Colérica, toxina, 738-39, 825, 863
Colesterol, 68
Colicina, 290
Coliforme, 927-29
Coliforme, test,
  método de filtro en membrana, 928
  método más probable, 928
Colitis, 915
Colitosa, 80
Colon, 726
Colonia, 108, 109
  aislamiento, 12-13
  factor estimulante de, 1001
  hibridación, 992
  recuento, *véase* Recuento en placa
  unidad formadora ,UFC), 147
Colonización, 720, 729, 722-23
  factor antígeno de ,CFA), 290, 731
Combustión espontánea, 451
Comercial, fermentador, 963-64
Cometabolismo, 669
Commamonas, 368
Commamonas acidovorans, 370
Commamonas testosteroni, 370
Comodidad química, 958
Competencia entre microorganismos, 614, 628
Competencia, artificialmente inducida, 283
Competencia, proteína específica de, 279, 282
Complejo B870, 551
Complejo, medio, 103, 107
Complejos, lípidos, 45-46
Complementación, 296-97
Complementación, ensayo, 296-97
Complementaria en cadena de bases, 47, 168, 171, 184
Complementario DNA (cDNA), 997-98
Complementario, metabolismo, 628
Complemento, 748, 767-69, 810
Complemento, ensayo de fijación, 812
Complemento, fijación, 769
Complemento, sistema, 767-69
  activación, 767-68
Componente captador de luz I, 549
Componente captador de luz II, 549
Componente inorgánico, metabolismo de energía, 28
Componentes alogenados, 581-82
Componentes aromáticos, 590
  anóxico degradación de, 590-91
  condensados, 700
  metabolismo, 585, 590-91
Componentes de metales pesados, 699
Componentes del cloro, 698
Compostaje, 155
Comprometido hospedador, 743, 852
Comptonia, 606
Compuestos con fósforo, 700
Compuestos con tres carbonos, utilización, 595-96
Compuestos de alta energía, 118-19, 583
Comunicación célula a célula, 629
Comunicación, 3-4
  características de la célula, 3-4
Comunidad, 4-5, 626
Comunidad, análisis, 618-19
  cromosoma tintado, 616-17
  FISH, 615-16
  medida de actividad microbiana, 615-18
  PCR, 618
  pruebas de ácido nucleico, 615-16
  transcripción inversa *in situ*, 616
Comunidades algas endolíticas, 491
Comunidades microbianas, 607
  análisis, 335
Concatémero DNA, 248, 252-53, 519, 532
Concha, foraminífera, 480
Condicional, mutante letal, 270
Condón, 902
Conducto torácico, 749
Conejo,
  conejos australianos, 848-50
  digestión, 654
  virus de la mixomatosis, 533
Conformacional, protección, 598
Congelación, 155
Congénita, sífilis, 868, 892
Conidios,
  de estreptomices, 414-15
  de hongos, 469, 482-83
Conjugación, 475-76
  bacteriana, 91, 265, 278-79, 288, 291-96
  descubrimiento, 280
  levaduras, 475-477, 485
  mapa genético, 316
  movilización del cromosoma, 291-94
  tipos, 475-76
  transferencia del DNA, 291
Conjugada, vacuna, 771
Conjugados, dobles enlaces, 545-46
Conjugativo, plásmido, 278, 288, 291-96
Conjugativo, transposón, 296, 298
Conjuntivitis, inclusión, 424
Consenso, secuencia, 189, 215
Conservación química de los alimentos, 945-44
Conservativa, transposición, 299
Consideraciones globales sobre la salud, 856-58
Consorcio, 352, 430-32
Constitutiva, enzima, 207
Contacto, dermatitis de, 774-75
Contacto, inhibición, 238
Contagio, 12
Contagiosa, enfermedad, 12
Contaminante, 109
Continua, fiebre, 148-51
Control de la transcripción,
  negativo, 215-17
  positivo, 217-18
Control global, 218-220, 222-24
Control traduccional, 225
Conversión fágica, 286, 736
Cooperación entre microorganismos, 628
Cooxidación, 669
Copolímero, 671
Coralinas, algas, 490

- Corineformes, 410
- Coronavirus, 256, 836, 882
- Correceptor CCR5, 898-99
- Correceptor CXCR4, 899
- Correceptores, 760
- Correpresor, 216
- Corriente citoplasmática, 486
- Corrinoide, 577-78
- Corrinoide, proteína, 577-78
- Corrosión, 630
- Corteza, endospora, 96
- Cortisona, 742
  - producción comercial, 971-72
- *Corynebacterium*, 411, 415, 721, 944
- *Corynebacterium diphtheriae*, 286, 339, 733, 735-36, 743, 812, 843, 849, 862-63, 869, 872-73, 875
- *cos región*, 254, 285, 311
- Cósmicos, rayos, 273
- Cósmido, 311
- Coulson, Alan, 18
- Covalente, enlace, 39, 40
- Covalente, modificación, enzima, 210-11, 212
- Covelita, 662
- *Coxiella burnetii*, 382, 869, 912
- Coxsackie, virus, 693, 882
- Crecimiento, 137-66
  - biosíntesis y, 134
  - características celulares, 3-4
  - control de, 138, 687-718
    - véase también Esterilización químico,
    - de hongos, 710-11
    - en procesos industriales, 699
    - virus, 708
  - críptico, 145
  - curva, 144-45
  - definición, 138
  - diáuxico, 219
  - disponibilidad de agua, 159-71
  - efecto de agentes antimicrobianos, 696
  - efecto de la temperatura, 151-57
  - efecto del pH, 158-59
  - en la naturaleza, 627-28
  - exponencial, 138, 142-43
  - factor análogo de, 688, 701-704
  - factor de, 105-6
  - influencias ambientales, 151-65
  - límites superiores de, 157
  - medidas de, 145-48
  - oxígeno, 161-65
  - parámetros, 143-44
  - patógeno, 731-32
  - población, 142-45
  - procesos industriales, 959-60
  - temperaturas extremas, 153-57
  - velocidad, 142
    - constante, 143
- *Crenarchaeota*, 336-37, 442-43, 456-57
  - hábitat, 456
  - metabolismo, 458
- Cresta, 471
- Creutzfeldt-Jakob, enfermedad, 261
- Crick, Francis, 18, 280
- Crioprotector, 155
- Críptico, crecimiento, 145
- Cristispira, 433
- cro gen, 252
- Cro proteína, 252
- Cromatina, 176
- Cromatóforo, 548
- Cromo, 105
- Cromoblastomicosis, 922
- Cromopéptido, 700
- Cromosoma, 22, 168, 177-79
  - artificial de levadura (YAC), 497
  - artificial, 492,
  - bacterial, 25, 316-18
  - bacteriano, 25
  - dominios superenrollados, 175
  - eucariótico, 25, 177-79, 186
  - movilización del, 291, 293-94
  - número, 178
  - procariótico, 25, 177-79, 283, 316-18
- Cromosomas artificiales, 494
- Cromosomas artificiales bacterianos (CAB), 496-7
- Crónica, carrera, 842
- Crónica, infección, 839
- Cronómetro evolutivo, 322, 330-31
- Crotonato, 584, 588
- Crotonil-CoA, 406
- *crt*, genes, 550-51
- Crudo, aceite, 8
- *Cryptococcus*, 861, 896-97, 922
- *Cryptococcus neoformans*, 805, 819, 897, 921, 922
- Cryptosporidiosis, 856, 861, 896-97, 935, 937
- *Cryptosporidium*, 861-62, 933
- *Cryptosporidium parvum*, 935, 936, 937, 948, 955
- *ctx*, genes, 739
- Cuantos, 541
- Cuarentena, 839, 855
- Cubierta de la espora, 96
- Cubierta refrigerante, fermentador, 961-62
- Cultivo,
  - aeróbico/anaeróbioo, 162-63
  - anaerobios, 902
  - complejo, 103, 107
  - definido, 103, 107
  - diferencial, 803
  - en Batch, 138, 144, 145, 148
  - enriquecimiento, *véase* Enriquecimiento cultivo axénico
  - esterilización, 109
  - gel (semisólido), 109
  - líquido, 109
  - macronutrientes, 104
  - medio, 103, 107-8, 109
  - micronutrientes, 105
  - procesos industriales, 959
  - selectiva, 803
  - sólido, 12-13
  - tampones, 159
- Cultivos de órganos, 238
- Cultivos monocapa, 238
- Curva de crecimiento de una etapa, 365-66
- *Cyanothece*, 418-19
- *Cyclospora*, 948, 955
- *Cylindrosperum*, 418-19
- *Cystobacter*, 392
- *Cytophaga*, 86, 353, 427-28, 594, 608
- *Cytophaga columnaris*, 427
- *Cytophaga hutchinsonii*, 594
- *Cytophaga psychrophila*, 427

- **D gen**, 785
- DAHP sintetasa, 210
- Dalapina, 668
- Dapsona, 877
- dATP, 181
- dCTP, 181
- DDT, 668-69, 854, 917
- Decarboxilación, ácidos orgánicos, 585-87
- Decarboxilasa, 804
- Decimal, tiempo de reducción, 689
- Decimal, valor de reducción, 693
- Decoloración,
  - aeróbica, 669-70
  - reductora, 540, 581-82, 633, 669, 677
- DEET, 915
- Defensas, 734
- *Defferibacter*, 353, 439
- Degeneración, código genético, 195, 269, 508
- Degranulación, 760
- *Dehalobacter*, 582
- *Dehalococcoides*, 582
- Dehidroemetina, 940
- *Deinococcus*, 31, 32, 353, 435-36
- *Deinococcus radiodurans*, 32, 33, 274, 304, 435-36, 693
- Delavirdina, 901
- Delbrück, Max, 18, 247
- Deleción, 270, 436 *véase* también Microdeleción
- Delong, Edward, 18
- Delta, agente, 538
- *Deltavirus*, 887
- Demanda biológica de oxígeno (DBO), 625, 635, 929, 930
- Demografía, contribución a urgencia patógena, 858
- Dengue, fiebre de, 841, 857-58, 860
- Dental, caries, 630, 720, 723-24, 742-43
- Dental, placa, 630, 720, 723
- Depósitos de hierro, 563
- Depsipéptido, 700
- Deriva antigénica, 868, 883
- Derivados aminoacídicos, 700
- Derivativos del benceno, 700
- Dermatitis de contacto, 774-75
- *Dermatophilus*, 415
- *Dermocarpa*, 418-19
- *Dermocarpella*, 418-19
- *Derxia*, 373
- *Derxia gummosa*, 373-74
- Desarrollo económico, contribución al resurgimiento de patógenos, 859
- Desarrollo industrial y emergencia de patógenos, 859
- Descomposición,
  - anóxica, 581, 645-46,
  - ciclo del carbono, 645-46
- Descoplante, 128
- Desechos de la comida, 943
- Desinfectante, 688, 697-99
- Desnaturalización, 39, 689
  - DNA, 174, 464
  - proteínas, 52-53, 203
- Desnitrificación, 540, 568, 625
  - ciclo de nitrógeno, 654-55
- Desoxiribonucleasa, 886
- Desoxiribonucleótido, 181
- Desoxirribosa, 44, 46, 132, 171, 187
- Desproporción, 540
  - de azufre, 572-73, 656
- Destilar, 980
- *Desulfacinum*, 397
- *Desulfitobacterium*, 403, 582
- *Desulfoarculus*, 397
- *Desulfobacter postgatei*, 397
- *Desulfobacterium*, 395
- *Desulfobacula*, 397
- *Desulfobotulus*, 395-96
- *Desulfobulbus propionicus*, 397
- *Desulfococcus* 395-96-97
- *Desulfofustis*, 396
- *Desulfomicrobium*, 396
- *Desulfomonas*, 395
- *Desulfomonile*, 395-97
- *Desulfonema*, 395-97
- *Desulforhabdus*, 396
- *Desulforhopalus*, 396
- *Desulfosarcina*, 395-97
- *Desulfosarcina variabilis*, 397
- *Desulfotignum phosphitoxidans*, 573
- *Desulfotomaculum*, 395-97, 403, 581, 598, 609
- *Desulfotomaculum orientis*, 574
- *Desulfovibrio*, 283, 354, 395-97, 598, 609, 656
- *Desulfovibrio desulfuricans*, 397
- *Desulfovibrio gigas*, 581
- *Desulfovibrio sulfodismutans*, 571, 573
- *Desulfurella*, 396
- Desulfurilación, 656
- *Desulfurococcus*, 443, 458-59
- *Desulfurococcus saccharovorans*, 462
- *Desulfurolobus*, 462-63
- *Desulfuromonas acetoxidans*, 64, 397
- Detección de anticuerpos, 829
- Detergentes catiónicos, 698-99, 798-99
- Determinantes adaptativos, 757
- Deuteromicetos, 482
- Dextranasa, 593
- Dextrano, 593, 724
  - degradación, 595
  - producción comercial, 401
- Dextransucrasa, 595, 724
- D-glutámico, 74, 76
- dGTP, 181
- Diabetes, 8, 1000
  - juvenil, 775-77
- Diacetilo, 401
- Diagnóstico, métodos,
  - aglutinación, 812
- Diagnóstico microbiológico, 797
- Diaponeurosporeno, 547
- Diarrea del viajero, 952-53
- Diarréica, enfermedad, 290, 378, 730, 738-40, 836, 841, 849, 936
- Diatomea, 153, 488, 490
- Diatomeas, tierra de, 490-91
- Diáuxico, crecimiento, 219
- Diazinón, 668
- Dicloroetileno, 582
- Diclorometano, 669
- Dicotómica, llave, 341-42
- *Dictyostelium discoideum*, 178, 486-87
- Dicumarol, 128
- Didanosina, 709
- Dideoxi azúcar, 80
- Dideoxicitidina, 901
- Dideoxiinosina, 709, 901
- Dideoxinucleótido, análogo, 305
- *Didinium*, 480-81
- Dieta, susceptibilidad a infecciones,742
- Diferenciación, 3, 4
- Diferenciación celular, 96
- Diferencial, medio, 797, 803
- 1, 3-Difosfoglicerato, 121, 122, 556, 583
- Difteria, 733, 743, 843, 849, 856, 862-63, 872-73
- Difteria antitoxina, 873
- Difteria vacuna, 771, 854, 873
- Difusión, 70
- Digestores de fangos, 930-31
- β-1,4-Diglucosa, 595
- Dihidrouridina, 198
- Dihidroxiacetona, fosfato, 120-21
- Dilución de punto final, 240
- Dilución, velocidad en quimiostato, 149, 150-51
- Diluciones seriadas, 147, 611
- Dímero, 213
- Dimetilamina, 366, 449
- Dimetilcarbonato, 366
- Dimetildisulfuro, 658
- Dimetiléter, 366
- Dimetilguanosina, 198
- Dimetilmercurio, 664
- Dimetilsulfónico propionato, 161
- Dimetilsulfopropionato, 657-58
- Dimetil sulfóxido (DMSO), 366, 580-81, 658
- Dimetil sulfuro, 366, 449, 581, 657-58
- Dinitrofenol, 128
- Dinitrogenasa, 598, 602
- Dinitrogenasa reductasa, 598, 600, 602
- Dinoflagelados, 488-90
- Dinoflagelados tóxicos, 488-89, 491
- Dióxido de azufre, 571, 946
- Dióxido de carbono, 449
  - aceptor de electrones, 569, 573
  - acetogénesis, 574-75
  - *Archaea*, 444

  - atmosférico, 644
  - autotrófica, 555
  - del ciclo del ácido cítrico, 129
  - en el rumen, 651-52
  - en fotosíntesis, 541-42
  - fotosíntesis anoxigénica, 551
  - fuente de carbono, 131
  - ojos del queso suizo, 412
  - productos de fermentación, 122, 376, 400, 584, 585, 646-47
  - reducción a metano, 577
  - síntesis de purinas, 133-34
  - tierra primitiva, 323
  - vía del acetil-574-75
- Dioxigenasa, 540, 589-90-91, 669
- Dioxigenasas secuenciales, 591
- Dipéptido, 51
- Diploide, 25, 475-76
- Diplomónada, 35, 336-37, 478
- Diplopteno, 68
- Directa, repetición terminal en DNA, 519
- Directo, radioinmunoensayo, 827-28
- Directo, recuento microscópico, 145-46
- Disacárido, 44, 595
- Disentería, 378, 481, 733, 875
- Disentería bacilar, 843
- Diseño computerizado de drogas, 716-17
- Disolución, métodos, 610-11
- Distancia evolutiva, 322, 330-33
- Diversidad catabólica, 130-31
- Diversidad somática, 786-87
- Divinilo, clorofila a, 422
- División binaria asimétrica, 391
- Divisoma, 138-40
- DMSO, *véase* Dimetil sulfóxido
- DMSO-TMAO reductasa, 105
- DNA, 1, 42, 43, 46, 174, 464, *véase* también Transcripción
  - bacteriófago, 523-26
  - banda negativa, 232
  - bandas complementarias, 171
  - cadena positiva, 232
  - cadenas antiparalelas, 168, 171
  - circular, 170, 176-77, 181-82, 251, 317, 515, 517
  - círculo covalentemente cerrado, 474
  - clonado, 306
  - cloroplasto, 177, 179, 473
  - complementario, 997-98
  - concatémero, 248, 252-53, 519-20, 532
  - curvado, 173, 218
  - demostración de que es el material genético, 280
  - desenrollamiento, 187
  - desnaturalización, 174, 464-65
  - determinación de secuencia, 303
  - diagnósticos, 830-32
  - DNA chips (microarrays) 509-10
  - doble hélice, 169, 171-72
  - efecto de la temperatura, 174
  - electrofórisis gel, 303
  - endonucleasa, 290
  - enlaces de puentes de hidrógeno, 40, 47, 48, 172, 174
  - estructura, 47, 48, 171-80, 187
  - estructura de horquilla, 173-74
  - estructura primaria, 47
  - estructura secundaria, 173
  - estructuras cruciformes, 173
  - eucariótico, 25
  - extremos cohesivos, 173-74, 251, 307
  - extremos romos, 307
  - fusión, 174
  - genoteca, 503
  - girasa, 168, 176, 704, 712
    - inhibición, 704
  - glicosilado, 243, 248
  - hiperternófilos, 463-64
  - huella dactilar, 313, 987, 1008, 1009
  - interacciones con proteínas, 173
  - ligasa, 183, 307
  - linear, 173-74, 177-78, 185-86, 435
  - macromolécula portadora de información, 169
  - mellado, 176, 276, 516
  - metilación, 243, 303
  - mitocondrial, 177, 179, 473-74
  - mutaciones, *véase* Mutación
  - origen del material genético, 326
  - palindrómico, 302
  - para vectores de clonación, 502
  - permutación circular, 248
  - peso molecular, 171-72
  - plegamiento, 173, 218
  - polimerasa, 105, 168, 180, 305, 312-13, 502
    - herpesvirus, 531
    - aplicaciones industriales, 972
    - Pfu, 313
    - actividad comprobante de copia, 313
    - *Taq*, 157, 313
  - polimerasa I, 182-84, 516
  - polimerasa II, 182
  - polimerasa III, 182-84, 516
  - procariótica, 25
  - propiedades codificantes, 169
  - proteína que se une a, 212-15, 226, 281, 282, 464
    - herpesvirus, 531
    - interacción con ácidos nucleicos, 212-13
    - estructura, 213-14
  - puente, 307
  - radiación ionizada, 692
  - recombinante, 307
  - relajado, 174, 177
  - reparación, 436
    - error, 273-74
  - repeticiones invertidas, 173, 191, 213, 220, 299
  - repeticiones terminales directas, 248, 519
  - repeticiones terminales invertidas, 298-99
  - repeticiones terminales lar Ras, 260
  - replicación, *véase* Replicación
  - restricción, Análisis enzimático, 303-4
  - secuencia de bases, 171
  - secuencia, 305-306
    - automática, 305-306
  - secuencias repetidas, 173, 179
  - sintético, 265, 306-7, 312, 998
  - superenrollado, 175-77, 286
    - negativo, 175
    - positivo, 176-77
  - surco mayor, 171, 213
  - surco menor, 171
  - triple, 225
  - vacunas, 772-74, 1004
  - vírico, 233
    - bicatenario, 234, 244-45, 256, 518-19, 532-33
    - faltos filamentosos monocatenarios, 517-18
    - virus animales, 529-30
  - y taxonomía molecular, 342-44
- DnaK, proteína, 223
- DNasa, 1, 1004
- Doble enlace, 40, 133
  - conjugado, 545-46
- Doble hélice, 169, 171-72
- Dodecanal, 380-81
- Dogma central de la biología, 170, 233
- Domagk, Gerhard, 18, 702
- Doméstica, agua residual, 929
- Dominio (proteína), 52, 748, 780-81
- Dominio (taxonomía), 22, 26, 27, 322, 335, 346-47, 477-78
  - características, 338-41
- Dominio superenrollado, cromosoma, 175-76
- Dominios de unión de GTP, 509
- Donador (macho) bacteria, 513
- Donadora, célula en la conjugación, 291
- Dosis de inmunogen, 756
- Dosis de radiación absorbida, 693
- Dosis de refuerzo, 767
- Doxiciclina, 892, 894, 912
- Dracunculiais, 856
- Drenaje de minas ácidas, 439, 453, 563, 625, 659
- Drogas antimicrobianas sintéticas, 699-700
- Drogas, abuso,
  - intravenosas, 850
  - tests de orina, 814, 827
- Drogas, resistencia, 269
- *Drosophila melanogaster*, 503
  - genoma, 503-504
- D-ti plásmido, 1005-6
- DTP vacuna, 873-74
- DTTP, 181
- Dubos, René, 691
- Dulbecco, Renato, 18
- *Dunaliella*, 160, 444-45, 479
- *Dunaliella salina*, 445
- Duodeno, 725-26

- **Eberth, C. J.**, 875
- Ebola, virus, 843, 860, 862
- Eclipse, periodo en multiplicación viral, 241
- Ecología, 1
- *Eco*RI, 302
- *Eco*RII, 303
- Ecosistema, 1, 6, 625
  - flujo energético, 626
- Ecotipo, 322, 347
- Ectoína, 160-61
- Ectomicorrizas, 673
- *Ectothiorhodospira*, 160, 354-55, 356, 445
- *Ectothiorhodospira mobilis*, 355, 357
- Edad, susceptibilidad a enfermedades infecciosas, 742
- Edema, 744
- Edema factor (EF), 733
- *Edwardsiella*, 377-78, 804
- Efavirenz, 901
- Efector, 209, 216, 222, 225
- Eflujo, 712
- Ehrlich, Paul, 18, 702
- *Ehrlichia*, 354, 382, 910-11
- *Ehrlichia chaffeensis*, 910-11
- *Ehrlichia equi*, 910
- Ehrlichiosis, 382, 856, 906, 910-11
- Ehrlichiosis granulocítica humana, 910
- Ehrlichiosis monocítica humana, 910
- Eje de rotación, 235, 236
- Electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente (DGGE), 607
- Electromagnética, radiación, 692
- Electrón, aceptor, 103, 114
  - respiración anaeróbica, 130, 568, 579-80
  - terminal, 116, 119
- Electrón, donador, 103, 114
  - inorgánico, 558-59
  - metanogénesis, 577
  - primario, 116
- Electrón, transportador, 116-18
  - asociado a membrana, 123
  - difusible libremente, 117
  - no proteico, 123-24
  - orientación en la membrana, 126
- Electrónica, torre, 115-16, 568
- Electrónico, microscopio, 56, 62, 63
- Electrónico, transporte, 123-25, 129
  - *Archaea*, 443
  - bacterias de azufre, 562
  - bacterias que oxidan el hierro, 564
  - bacterias reductoras de sulfato, 571-72
  - conservación de la energía, 125-28
  - desacopladores, 128
  - fijación de nitrógeno, 599-600
  - fotosíntesis, 548-49
  - fotosíntesis no oxigénica, 551-52
  - fotosíntesis oxigénica, 553
  - halófilos extremos, 443
  - inhibidores, 128
  - respiración anaeróbica, 568
  - reverso, 540, 551-52, 558, 563
- Electroporación, 265, 283, 308, 990
- Elemental, azufre, 92, 119, 560, 561
  - aceptor de electrones, 462, 571
  - desproporcionado, 573
  - donador de electrones, 551, 559, 657
- Elemental, cuerpo, 424
- Elemento genético no cromosómico, 179
- ELISA, 797, 812, 813-14, 816, 823-25
  - directo, 824
  - en orina, para drogas, 814
  - HIV-ELISA ensayo de anticuerpos, 824, 828, 903
  - indirecto, 824, 825-26
  - sandwich, 824
  - virus, 835
- Elongación,factor, 2, 736
- Embarazo, ensayo de, 815
- Embarazo, rubeola, 880-81
- Embden-Meyerhof, ruta, *véase* Glicolisis
- Empalme, 168, 192-93, 212, 229, 255, 505
- Enantiómero, *véase* Estereoisómero
- Encefalitis, 856, 861
- Encefalitis californiana, 845-46
- Encefalitis equina venezolana, 861
- Encefalitis espongiforme bovina, 261, 854, 862, 955
- Encefalomielitis 861
  - alérgica, 775
  - sarampión, 879
- Encefalomielitis alérgica, 775
- *Encephalitozoon*, 478
- *Encephalitozoon cuniculi*, 505
- Encías, 723
- Endémica, enfermedad, 839, 840
- Endocitosis, 242
  - entrada del virión, 527
- Endoflagelos, 432
- Endógeno, pirógeno, 740, 744
- Endomicorrizas, 673
- Endoplasmático, retículo, 475
- Endosimbiontes, de ciliados, 480
- Endosimbiosis, 22, 27, 322, 328-29, 337, 422, 469, 470
- Endospora, 56, 95, 100
  - activación, 99
  - central, 96
  - contenido en agua, 690
  - crecimiento, 100
  - estructura, 96
  - formación,96, 98, 99
  - formadores de, bacilos, 403-8
  - formadores de, cocos, 403-8
  - germinación, 96, 98, 100
  - longevidad, 97
  - núcleo, 96
  - resistencia a calor, 10, 95, 96, 698
  - subterminal, 96
  - terminal, 96
  - tinción, 96
- Endotoxina, 79, 80, 81, 378, 720, 740-41, 744, 989

  - estructura y función, 740
  - Lintulus, ensayo, 740-41
  - *Staphylococcus aureus*, 947
  - *Yersinia pestis*, 919
- Endurecimiento, 876
- Energía, 110
  - almacenamiento, 119
  - conservación, membrana citoplasmática, 69-70
  - de activación, 103, 111
  - flujo en ecosistemas, 626
  - fuente, 116
  - represión catabólica, 219-20
  - compuestos químicos inorgánicos, 130-31, 359, 558-59
  - libre, 103, 110-11
    - de formación, 111
  - metabolismo,
    - *Crenarchaeota*, 458
  - procesos que la requieren, 103
- Enfermedad, 720-21
  - columnar, 428
  - de *Chlamydia*, 423-25, 893-94
  - de tsutsugamushi, 912
  - por contacto directo, 844
  - transmitida por animales, 906
  - transmitida por la comida, 855, 854, 946-47
  - alimentación del rumiante, 654
  - vírica endémica, 883
- Enfermedades de transmisión sexual (STD), 423, 431, 433, 844, 850-52,
- Enfermedades emergentes, 839, 858
  - reconocimiento e intervención, 863
- Enfermedades infantiles, en adultos, 855
- Enfermedades infecciosas con origen común, 934-940
- Enfermedades transmitidas por artrópodos, 909
- Enfermedades transmitidas por sólidos, 920-21
- Engrosamiento, problemas alcantarillado, 362
- Enlace, 39-42
  - covalente, 39-40
  - de hidrógeno *véase* Puentes de Hidrógeno
  - doble, 40, 133
  - fuerza del, 39-42
  - glicosídico, 39, 43-45
  - modelos en biomoléculas, 41
  - peptídico, 39
  - triple, 40
- Enlaces fosfato de alta energía, 118
- Enlatado de alimentos, 8, 943, 945, 946
- Enolasa, 121
- Enriquecimiento, cultivo de, 1, 16, 615-19, 805, 806
  - *Bacteria* nitrificante, 360
  - *Bacteria* oxidante de hidrógeno, 364
  - *Bacteria* reductor de sulfato, 397
  - citofago, 427
  - cuerpos fructiferos, 392
  - *Hyphomicrobium*, 390
  - metanotrofos, 367
- Ensilaje, 155, 400
- *entA* gen, 948
- *Entamoeba*, 479
- *Entamoeba histolytica*, 480-81, 505, 939-40
- Entéricas, bacterias, 352, 375-79, 585, 804
  - características, 376
  - diagnóstico, 378
  - identificación, 377-78
- Enteritis, 861
- Enteritis por *Campylobacter*, 860
- *Enterobacter*, 377-79, 585, 609, 799, 801, 803, 853
- *Enterobacter aerogenes*, 379, 927-28
- Enterobactina, 105, 106
- *Enterococcus*, 295, 400, 721, 726, 832, 853
- *Enterococcus faecacium*, 713
- *Enterococcus faecalis*, 726-27, 799
  - resistencia antimicrobiana, 714
- Enterocolitis, 951
- Enterotoxina, 290, 378, 720, 733, 738-40, 863, 886
- Enterotoxina A, 948
- Enterovirus, 836
- Entner-Doudoroff, ruta de, 369, 371, 443
- *Entomoplasma*, 409
- *env* gen, 258, 259, 535, 537
- Enzima, 1, 3, 50, 103, 11-13
  - abzima, 787
  - activa en frío, 154
  - activadora de aminoácidos, 197
  - alostérica, 207
  - catálisis, 112-13
  - cofactores, 105
  - constitutiva, 207
  - en viriones, 235, 236
  - especificidad, 112
  - estructura, 113
  - extracelular, 972
  - harófilo, 639
  - hipertermófilo, 973
  - inducción, 215-17
  - inhibición por producto, 209
  - inmovilizado, 958, 973-75
  - isoenzima, 209-10
  - ligada, ensayo de inmunoadsorbancia, *véase* ELISA
  - modificación covalente, 210-11, 212, 603
  - nomenclatura, 113
  - producción comercial, 972-74
  - regulación de la actividad, 207, 208-11
  - regulación de la síntesis, 207, 211-28
  - represión, 215-17, 222
  - retroinhibición, 207, 208, 211
  - reversibilidad de la reacción, 113
  - sitio activo, 112, 209
  - sitio alostérico, 209
  - sustrato, complejo, 112-13
  - termófilo, 156-57
- Enzimas activas en frío, 154
- Enzimas del hígado, test de Ames, 276
- Enzimática, inclusión, 974
- Eosina-azul de metileno, asar (EMB), 800, 803
- Epibionte, 430
- Epidemia con origen común, 839, 843, 846-47, 859
- Epidemia hospedador a hospedador, 839
- Epidémico, 847-48
  - control, 854
  - fuente común, 839, 843
  - hospedador-hospedador, 839, 847
  - síndromes clínicos, 863
  - tifus, *véase* Tifus
- Epidemiología, 838-66
  - terminología, 840-42
  - salud pública, 854-55
  - SIDA, 850-52
- Epidérmico, factor de crecimiento, 1001
- Epidermis, 722
- *Epidermophyton*, 922
- Epilimnion, 634
- Episoma, 287, 293
- Epiteliales, células, 721
- Epitopo, *véase* Determinante antigénico
- Epóxido benceno, 591
- Epstein-Barr virus, 257-58, 531, 832
- *Epulopiscium fishelsoni*, 64, 65
- Ergosterol inhibidor, 710
- Ergot, 482
- Eriodictiol, 681
- Eritema migratorio, 913-14
- Eritrocitos, 749
- Eritrogénica, toxina, 733, 777, 863
- Eritromicina, 339, 700, 707, 807, 872
  - producción, 418
    - comercial, 964
  - resistencia, 712
  - síntesis, 960
- Eritropoyetina, 1001
- Eritrosa-4-fosfato, 133
- Erosión, 630-31, 657
- *Erwinia*, 289, 354, 944
- *Erwinia cartovora*, 375
- Escalado, 958, 963
- Escherich, Theodor, 875
- *Escherichia*, 159, 283, 289, 301, 354, 377-78, 581, 585, 609, 721, 739, 740, 804, 805, 944
  - endotoxina, 81
- *Escherichia coli*, 376, 509, 581, 799, 843, 927, 965, 1005
  - aerobactina, 731
  - ataque por Bdellovibrio, 386
  - atenuación, 222
  - bacteriófago, 517-18
  - colicinas, 290
  - control global, 222
  - cromosoma, 177-79, 316-18, 617
  - descubrimiento, 875
  - DNA, 172
  - DNA polimerasa III, 503
  - en alimentos, 952-53
  - en clonación molecular, 989
  - endonucleasas de restricción, 302-4
  - enterobactinas, 105-06
  - enterohemorrágicas, 856, 952
  - enteropatógenas, 290, 378, 730, 733, 739, 825, 952-53
  - enterotóxicas, 731, 952
  - enterotoxina, 739
  - factores de virulencia, 863
  - factores sigma, 189, 223
  - fimbrias, 730
  - fisión binaria, 139
  - flagelos, 83
  - FtsZ, 139-40
  - gen familias, 502
  - genes de luciferasa, 991, 995
  - genoma, 499, 502
  - identificación, 801, 803
  - infecciones nosocomiales, 849, 853
  - intestino, 726
  - mapa genético, 316-18
  - medio de cultivo, 107-8, 800
  - nucleoide, 25
  - número de genes, 26
  - opatogénico, 742
  - pared celular, 74, 75, 76
  - Pásmido F, 496
  - pasteurización, 692
  - pelos, 91
  - periplasma, 81
  - piel, 722
  - plásmidos, 286, 288
  - procariota modelo, 316
  - promotor, 993
  - quimiotaxis, 87-88
  - quimiotaxis, proteínas aceptores de metilos, 227
  - reducción de nitratos, 570
  - regalón maltosa, 217-18
  - replicación, 181-85
  - requerimiento de oxígeno, 162
  - RNA polimerasa, 187, 339
  - rumen, 654
  - sangre, 798
  - sistema fosfotransferasa, 72, 73
  - sondas de ácidos nucleicos, 832
  - tamaño, 65
  - temperaturas cardinales, 152
  - tiempo de generación, 628
  - tinción de Gram, 59
  - tracto urogenital, 729
  - transducción,284-85
  - transformación, 283
  - transmitida por el agua, 934-35
  - transportadores de electrones, 126
  - transporte activo, 73
  - triptófano operón, 220-21
  - uso de codones, 197
- Esclerosis múltiple, 775
- Escotocromogénesis, 413
- Escotofobotaxis, 89
- Escrutinio, 265-66, 991
  - productores de antibióticos, 964-66
- Esferoplasto, 78
- Esfingolípido, 427
- Esfingomielina, 427
- Esfingosina, 427
- E-sitio, ribosoma, 200-01
- Esmalte, diente, 723-24
- Esparsomicina, 339
- Especia, esterilización por radiación, 693
- Especies, 322
- Especies, concepto, 345-48
- Especimen,
  - aislamiento de patógenos, 797
  - condiciones asépticas, 797
  - recoger muestras, 797
- Espectinomicina, 418, 601, 712
- Espectrofotómetro, 148
- Espectrometría de masas, 509
- Espícula, herpesvirus, 531
- Espiramicina, 707
- Espiriloxantina, 547
- Espiroplasmosis de la abeja de la miel, 410
- Espora,
  - actinomicetos, 414, 632
  - estrptomiceto, 416
  - hongos mucosos, 487
- Esporóforo, 416
- Esporotrichosis, 922
- Esporozoito, 481, 916
- Esporozoo, 469, 481
- Esporulación, 95
  - *Bacillus*, 98, 226
  - bacterial, 96-98
- Esquistosomiasis, 827, 841
- Esquizonte, 916
- Estado de equilibrio, 148, 150
- Estafiloquinasa, 863
- Estanques, 634
- Estavudina, 709, 901
- Éster, 41
- Estereoisómeros, 39, 50
  - aminoácidos, 50
  - azúcares, 43-44, 50
- Esterilidad, 1
- Esterilización, 10, 11, 688
  - de medios de cultivo, 109
  - fría, 698
  - por calor, 689-90, 692, 945
  - por filtración, 694-95
  - por radiaciones, 692, 694
- Esterilizantes, 698
- Esteroides, 727
  - adrenocorticoides, 971
  - producción comercial, 971-72
- Esteroides, antibióticos, 700
- Esterol, 5
  - estructura, 68
  - membrana, 68, 409
  - metanotrofos, 366
  - síntesis, 589
- Éster-unidos, lípidos, 338

Estimulón, 222
Estómago, 725-26
  barrera a la infección, 743
  biota, 725
Estomatitis vesicular virus, 525
Estornudar, 846, 868-69, 883
Estreptococo, garganta, 815, 870
Estreptolisina O, 733, 735, 812
Estreptolisina S, 733
Estreptomicetos, 415
Estreptomicina, 339, 700-701, 704-706, 807
  estructura, 708
  modo de acción 202
  producción comercial, 964
  producción, 418
  resistencia, 711-13
Estreptoquinasa, 733, 735
Estreptovaricina, 701, 705
Estrés, susceptibilidad a infecciones, 742
Estrógeno, 971
Estromatolitos, 322-23-24
Estroma, 473, 545
Estructura cuaternaria, 39
Estructura de horquilla, 173-74
Estructura terciaria, 39
  proteínas, 52
Estructura/Función de la célula, 55-101
Estructuras de superficie de la célula, 90-92, 780-81
Etanol, 584, 976 *véase* también Bebidas alcohólicas
  producto fermentación, 121-22, 376, 400, 406, 585, 587, 648, 960
  usos industriales, 981
Eteno, 582
Éter, 41
  aromático, 700
Éter-unidos, lípidos, 68, 338, 437
Etidio bromuro, 272
Etileno, 40, 366, 584, 601, 669
Etileno, óxido de, 698, 945-46
Etilmetanosulfonato, 272
Etiquetado celular, 614
Eubacterium, 417, 721, 725
Eubacterium limosum, 574
Eucariota, 22, 27
  cromosomas, 25, 177-79, 186, 475
  elementos transponibles, 298
  esteroles, 68
  estructura celular, 23, 469-70
  estructuras que contienen membranas, 475
  evolución, 328-29
  expresión génica, 229
  genética, 170-71, 475
  genomas, 504
  mRNA, 192
  multiplicación vital, 255
  núcleo, 469-470
  promotores, 190
  proteínas secretorias, 203
  reproducción sexual, 265
  ribosomas, 201-02, 470
  RNA polimerasa, 190
  temprana, 478
  traducción, 170
  transcripción, 170
  transfección, 28-83, 990
  vectores de clonación, 990
  vectores de expresión, 995
Eucariotas sin mitocondrias, 477
Euglena, 479, 488-92
Euglena gracilis, 505
Euglenoid, 479, 488
Euglenophyta, 488
Eukarya, 322, 335, 469
  árbol filogenético, 27
  diversidad, 34-36
  dominios, 477-78
  evolución, 26, 27
  filogenia, 336-37-38, 477-78
  lípidos, 338, 340
  pared celular, 338
  propiedades fenotípicas, 338-40
  reinos, 477-78
  RNA polimerasa, 338-39-40
  secuencia firma, 334
  sensibilidad antibióticos, 339
  síntesis de proteínas, 339-40
Euryarchaeota, 336,-37, 453
  hipertermofílico, 453-54
Everinomicina, 700
Evolución especies bacterianas, 347
Evolución, 1, 26-28 *véase* también Célula primitiva
  Archaea, 465-66
  autotrofo, 327
  célula, características, 3, 4
  cianobacteria, 421-22
  cloroplasto, 328-29, 336, 422-23, 474
  cronómetros, 330-31
  eucariotas, 328-29
  fotosíntesis, 327-28
  gen, familias, 502
  mitocondria, 329, 336, 474
  rRNA, 330-33
  sistema inmune, 780-81
Excisionasa, 254
Excitón, 549
Exclusión alélica, 786
Exfoliativa toxina, 733
Exón, 168, 171, 178, 192
Exonucleasa, 183
Exonucleasa, fidelidad de copia, 184-85
Exosporio, 96
Exotoxina, 720, 733, 735-36, 740
Exotoxina A, 733, 737, 871
Exotoxina B, 871
Exponencial, crecimiento, 138, 142-43
Exponencial, fase, 14-45
Expresión vector, 987, 993-95
  circuitos reguladores, 993-94
  estabilidad de proteínas, 999
  eucanótico, 995
  iniciación de traducción, 995-96
  procariótico, 995
  promotor, 993
  uso de codones, 995, 999
  vector de fusión, 999
Exteína, 212
Extracelular, enzima, 972
Extracto de levadura, 976
Extravasación, 75-59
Extremo, ambiente, 153,-57, 421, 973
Extremo, barófilo, 639
Extremo, halófilo, 138, 160, 336-37, 442, 444-45
  agua, balance en, 446
  componentes citoplasmáticos, 447
  definición, 444
  fisiología, 445
  hábitat, 445-46
  síntesis de ATPmediada por luz, 447-48
  taxonomía, 445
Extremo, sicrófilo, 638
Extremófilo, 22, 29, 138, 153, 973
  Archaea, 32-34
Extremozima, 958, 973
Exxon Valdez, 667

F1 bacteriófago, 517
Fabricación casera, 982-83
Fabricación de cerveza, 958, 980-81
  casera, 982-83
Factor *a*, 476
Factor cuerda, 414
Factor de crecimiento β células T, 793
Factor de necrosis tumoral, 793
Factores de coagulación, 1001, 1004
Factores de liberación, 201-2
Facultativo, aerobio, 161-62
Facultativo, quimiolitotrofo, 361, 364
FAD, 123-24, 129, 597, 970
Fagémidos, 999
Fago auxiliar, 285
Fago, grupo, 247
Fagocitos, 732, 734, 748, 751-52, 810
Fagocitosis, 469, 490, 752, 769, 810, 816
  en protozoos, 479
Fagolisosoma, 753, 760
FAME, 322, 344-45
Familia (taxonomía), 322, 346-47
Fase de muerte, 144-45
Favus, 922
fd bacteriófago, 517-18
Fecal contaminación, 928, 934
Fecal cultivo, 800
FeMo-co, 598, 602
Fenilalanil tRNA, 198
Fenilalanina, 40, 41
  código genético, 195
  desaminasa ensayo, 805
  estructura, 49
  fermentación, 584
  producción comercial, 970
  síntesis, 133, 210
Fermentación, 103, 119, 540, 582-83, 646-48 *véase* también tipos específicos
  a gran escala, 961-63
  ácido mixta, 376, 585
  alcohólica, 123, 371, 585, 960
  balance, 583
  diversidad, 585-86
  energética, 582-85
  escalado, 983
  glicolisis, 120-22
  gran escala, 963
  levadura, 123
  productos, 122
  productos, 123, 376-77, 406, 582-85
  reacciones acopladas, 547-48 *véase* también Sintrofia directa,
  rumen, 651-52
  secundaria, 411
  sin fosforilación del substrato, 585-86
Fermentador, 958, 961-63
  aeróbico, 961-63, 976
  anaeróbico, 961
  comercial, 963-64
  control y monitorización, 960-61
  laboratorio, 963-64
  tamaño, 960-61
Fermentados alimentos, 945
Fermentados productos, 400
Ferredoxina, 125, 552, 583-84, 601
Férrico hidróxido, 387, 563
Férrico, ion: aceptor de electrones, 659
Ferroglobus, 455, 458-58
Ferroglobus placidus, 455
Ferroplasma, 158, 451, 661
Ferroplasma acidophilum, 660-61
Ferroso, sulfuro, 657
Fertilizante, nitrógeno, 655
Fibras de cola, virus, 236, 242
Fibrinógeno, 749
Fibrinolisina, 863, 886
Fibrobacter, 594
Fibrobacter succinogenes, 651, 653
Fiebre, 720, 740, 744
  amarilla, 854-57, 861
  continua, 744
  de las trincheras, 382
  de Potomac, (caballos), 382
  hemorrágica por Ébola, 855, 857
  intermitente, 744
  maculosa, 382
  Pontiac, 938
  púrpura del Brasil, 860
  púrpura, 733, 777, 832, 860, 868, 870
  recurrente, 433-35, 744, 855
  remitente, 744
  tifoidea, 378, 396, 733, 744, 811, 843, 855, 875, 928, 939, 951
  tifoidea, vacuna, 771
  vacuna, 771, 858
Filamentosas, bacterias, 64
Filamentosos,
  actinomicetos, 414-18
  bacteriófagos, 517-18
Filogenia, 22, 26-27, 322, 336, 618
  Archaea, 442-43
  Bacteria, 353-354
  basada en la secuenciación rRNA, 335-38
  Eukarya, 477-78
Filovirus, 859-60, 862
Filtración, purificación de agua, 928, 933
Filtro de esterilización, 694-95
  tipos de filtros, 694-95
Filtro trampa, 930-31-32
Fimbrias, 91, 734
  tipo 730
Fischerella, 418-19
FISH, 322, 334-35, 607, 615-17
Fisiología microbiana, 19
Fistula, 651
Flagelación,
  lofotrica, 82, 84, 387
  peritrica, 82, 83, 84, 85, 372, 375, 380
  polar, 82, 84, 85, 372, 380, 383
Flagelaciónb lofótrica, 82, 84, 387-88
Flagelados, 336, 469, 479-80
Flagelar, motor, 83, 84, 227, 228
Flagelina, 54, 83, 84, 812
Flagelos, 56, 82-85, 91
  bacterial, 82-83
  control, 227
  de algas, 488
  espiroqueta, 431-32
  estructura, 83
  flagelados, 479-80
  movimiento, 84
  síntesis, 83-85
  tintados, 82
Flato, 727
Flavín mononucleótido, *véase* FMN
Flavín-adenín dinuclótido, *véase* FAD
Flaviviridae, 887
Flavobacerium johnsoniae, 86, 87
Flavobacterias, 336, 353, 427, 804, 944
Flavonoide, 681
Flavoproteína, 123-24, 127
Flavotoxina, 599, 601, 603
Fleming, Alexander, 18, 702
Flevibacter, 428
Flexirubinas, 428
Flexistipes, 439
Floculación, 933
Florey, Howard, 702
Fluconazol, 710
Fluido, mosaico, 67
Fluorescencia, 60
Fluorescencia,
  -activado, Citómetro de flujo (FACS), 822-23
  espectrómetro, 822
  microscopio, 57, 60
Fluorescente, anticuerpo ensayo, 621-22, 797, 820-23
  directo, 821
  indirecto, 821
  microorganismos en partículas de suelo, 631
  muestras naturales, 613-14

- Fluoro-4-quinolona, 700
- 5-Fluorocitosina, 710
- Fluorouracilo, 703
- Fluoruro, 724
- FMN, 123-24, 970
- Foaforilación, oxidativa, 103
- Focos de infección, 238-39, 256
- Fólico, ácido, 134, 584, 701, 703
- Folículo piloso, 722
- Fomite, 839, 846, 849
- Foraminíferos, 480
- Forma replicativa (RF), 501, 521, 523-24
- Formación, endospora, 100
- Formaldehído, 390, 591-94, 698, 946
  - esterilización fría, 698
- Formamida, 366, 619
- Formato, 366, 390, 449, 652
  - donador de electrones, 582
  - producción en el rumen, 652-53
  - producto de fermentación, 584-85
- Formato deshidrogenasa, 105, 197
- Fórmico hidrógenoliasa, 121, 377
- Formilmetionil-tRNA, 201
- Formilmetionina, 339
- Formiltetrahidrofolato sintetasa, 584
- Fortificado, vino, 986
- Foscarnet, 709
- Fosfatasa, 226, 752
- Fosfatasa alcalina, 629, 825
- Fosfato éster, 41
- Fosfoadenosín fosfosulfato, 571-73
- Fosfodiéster, enlace, 39, 47, 48, 497
- Fosfoenolpiruvato, (PEP), 596
- Fosfoglicerato, 133
- Fosfogliceroquinasa, 584
- 6-Fosfogluconato, 369
- Fosfolípido, 46, 596
- Fosfomicina, 700
- Fosforilación a nivel de sustrato, 103, 119, 399, 562, 573, 582-86
- Fosforilasa, 594-95
- Fósforo, 104
- Fosforolisis, 593, 712
- Fosforribuloquinasa, 555
- Fosfotransferasa, sistema, 72
- Fósil, 323
  - algas, 489-90
  - combustible, 664
  - foraminíferos, conchas, 480
- Fótica, zona, 638-40
- Fotoautotrofo, 131, 541
- Fotobiodegradable, plástico, 670-71
- Fotocromogénesis, 413
- Fotofosforilación, 103, 120, 128, 354, 540, 550
  - cíclica, 550, 554
  - no cíclica, 553-54
- Fotómetro, 148
- Fotoprotector, agente, 545
- Fotorreceptor, 89-90
- Fotosíntesis, 472-73, 505, 540, 541, 545
  - anoxigénica, 354, 540-43, 548-50, 637
    - flujo de electrones, 551-52
    - fototrofos oxigénicos, 554-55
    - oxidación de hierro, 565
  - bacterias rojas, 548-50
  - ciclo del carbono, 644-45, 646
  - evolución, 327-28
  - flujo de electrones, 549-50
  - fotofosforilación, 550
  - genética, 550-51
  - medidas en la naturaleza, 621
  - pigmentos accesorios, 548
  - pigmentos, 542-43
  - reacción luminosa, 541
  - reacción oscura, 541
- Fotosintética membrana, 542-43, 548-50
  - cianobacterias, 418
- Fotosistema I, 552-54
- Fotosistema II, 552-54
- Fototaxis, 56, 87, 90, 91
- Fototrofo, 22, 28, 131, 540-41, 645
  - anoxigénico, 354
  - cianobacterias, 418-21
  - flagelados, 479
  - medida en la naturaleza, 621
  - proclorofitas, 422-24
- FoVa-co, 599
- Fox, George, 18
- Fraenkel, A., 875
- Fragmento de Okazaki, 183
- *Francisella*, 354
- *Francisella tularensis*, 844, 864
- *Frankia*, 415, 598, 655, 684
- Franklin, Rosalind, 18
- Freeze, Hudson, 18
- Fructificante cuerpo,36
  - bacterias deslizantes, 392-94
  - setas, 483, 982-84
- Fructificantes, mixobacterias, 392-95
  - características, 393
  - ciclo de vida, 392-95
- Fructosa, 44, 973
  - bisfosfato aldolasa, 112-13
  - producto fermentación, 585
- Fructosa-6-fosfato, 121, 555, 557
- 2 Fructosa-6-P, 593
- Fructosa-I, 6-bisfosfato, 120-21, 584, 593
- Frústula, 490
- Frutas, zumo, 371-72
- Fucínico, ácido, 490
- Fuentes termales, 152, 155-156, 421, 434-35, 456, 621
- Fumarato, 129
  - bioquímica de la fijación de nitrógeno, 682
  - aceptor de electrones, 581
  - fermentación, 584
  - metabolismo, 595
  - respiración, 568
  - succinato, par, 116
- Fumarola, 155
- Funciones autocrinas, 792
- Fungicida, agente, 688, 696
  - biodegradación, 668
- Fungiestático agente, 688, 696
- Furanonas, 630
- Furazolidona, 937
- Furoato de diloxanida, 940
- Fusídico ácido, 339, 700
- Fusión,
  - ácido nucleico, 174
  - proteína, 999, 1001
  - vector, 999
- *Fusobacterium*, 721, 723

- **Gaertner, A. A. H.**, 875
- *gag* gen 258-59-60, 535, 537
- α-Galactosidasa, 727
- β-Galactosidasa, 215-16, 219, 310, 492-94, 593, 727, 804, 824
- *Gallionella*, 354, 387, 384, 563, 564, 659
- *Gallionella ferruginea*, 391, 564
- Gametangios, 482
- Gameto, 475, 916
- Gametocito, 916
- Gamma-rayos, 273
  - esterilización, 693
- Gancho, flagelo, 83-84
- Ganciclovir, 709
- Gangliosida, 427
- Gangliósido GMI, 739
- Garganta, protozoo, 479
- Garrapata de la madera, 910
- Garrapata del ciervo, 912-14
- Garrapata, transmisor de enfermedad, 435, 859, 863, 910-14
- Gas nervioso Sarin, 865
- Gas, vesículas, 56, 82, 94-95, 340, 420, 451, 565
- Gaseosa, gangrena, 408, 733, 735, 875
- Gasohol, 981
- Gasolina, tanque de almacenamiento, 667
- Gastritis, 886
- Gastroenteritis, 378, 380, 733, 861, 935
- Gastrointestinal, tracto,
  - anatomía, 725-26
  - flora normal, 721, 725-27, 742
- GC, contenido, 174
- Géiser, 152
- Gel electroforesis,
  - DNA, 303, 305
- Gelatina, test de liquefacción, 804
- Gemación, *Bacteria*, 388-89
  - características, 387-88
  - *Plantomyces*, 425
- Gemación, levadura, 483-84
- *Gemmata obscuriglobus*, 427
- Gen, 26, 168
  - agrupación, 316
  - aislamiento y caracterización, 607
  - amplificación, 967
  - *anf*HDK, 602
  - asistente, 179
  - definición, 169
  - división, 178
  - duplicación, 502
  - expresión, 26
    - eucariotas, 229
    - procariotas, 229
    - regulación, 206-30, 509
    - superenrollado,176
  - familia, 318, 494
    - evolución, 502
  - función, 169, 508-10
  - marco de lectura abierta, 196
  - número de células, 26
  - regulación, 508-10
- Generación, 142
- Generación espontánea, 1, 9-11
- Generación, tiempo de 138, 142-43, 628
  - cálculo, 143-44
- General, recombinación, 276-78
- Generalizada, transducción, 283-84-85
- Género, 322, 346, 348
- Genes de mantenimiento de la célula, 179
- Genes de resistencia, 711
- Genes específicos, 681
- Genes partidos, 265, 315
- Genes tempranos inmediatos, 249
- Genes tempranos retardados, 249
- Genes, librería de, 308, 497, 508
- Genes, reordenación de, 766-67
  - inmunoglobulinas, 785-86
- Genes, superfamilia de, 780-81
- Genética, 168-69
  - bacteriana, 19
  - diversidad,
    - morfología y, 615
    - pruebas filogenéticas, 616
  - enfermedad, 1008, 1010
  - eucariótica, 170-71, 475-76
  - fijación de nitrógeno, 601-603
  - humana, 1008-10
  - ingeniería, 8, 302, 987 *véase* también Clonación
    - y genética de animales y plantas, 1008, 1010
    - investigación aplicada, 1000-10
    - bacteriófago, 246
    - productos de mamíferos, 1000-1001
    - principios, 987-89
    - plásmido Ti, 676-77
  - levaduras, 475-77
  - procariótica, 170-71
  - recombinación, *véase* Recombinación Genética,
  - transformación, *véase* Transformación Genética, cambio, lambda
  - tinciones, 615-17
  - vacunas, 1004
- Genético, código, 170, 194-97
  - degeneración del, 195, 269, 508
  - flexibilidad, 195
  - mitocondrias, 196
  - *Mycoplasma*, 196
  - *Paramecium*, 196
  - universalidad, 196
- Genético, elemento, 177-80
- Genético, intercambio en procariotas, 265
- Genético, mapa, 265, 295
  - análisis de recombinación, 277
  - bacteriano, 316-18
  - bacteriófago lambda, 252
  - bacteriófago Mu, 512-13
  - conjugación, 295, 316
  - cromosoma artificial bacterial, 496
  - *Escherichia coli*, 316-18
  - estructura fina, 316
  - MHC, 782
  - mitocondrias, 499-500
  - plásmido F, 287
  - plásmido R100, 290
  - retrovirus, 258-59
  - SV40, 529
  - T7, bacteriófago, 518
  - TMV, 522
  - transducción,316
  - transformación, 316
  - VP1, VP2, VP3, 530
- Genético, marcador, 265
- Gengou, O., 875
- Genistein, 681
- Genital, especimen, cultivo de, 801
- Genital, herpes, 539, 832, 891, 895
- Genoma, 22, 24, 168, 177, 494
  - adenovirus, 534
  - análisis, 499
  - *Archaeoglobus*, 455
  - bacteriófago lambda, 251
  - cloroplasto, 512-13
  - eucariótico, 504
  - HIV-1, 535
  - hepadnavirus, 537
  - herpes simple, 531
  - levadura, 504, 506
  - mapa, 497
  - micoplasma, 409
  - mitocondrial, 505
  - nuclear, 507
  - procariótico, 498
  - reovirus, 528
  - retrovirus, 258-60, 535
  - RNA, 534
  - segmentado, 527, 883
  - SV40, 529
  - técnicas de clonación genómica, 494-95
  - Thermoplasma, 453-54
  - TMV, 522
  - virus hepatitis B, 537
  - virus, 233-34, 246, 248
- Genomas extranucleares, 505-506
- Genomas, procarióticos, 598 - 601
- Genómica, 494, 507
  - comparativa, 502
  - estructural, 508-509
  - funcional, 508
  - hibridación, 322,342-44
  - microarrays, 509
- Genotipo, 265
  - designación, 266
- Gentamicina, 701, 706, 807
- *Geobacter*, 354, 609
- *Geobacter metallireducens*, 580

Geodermatophilus, 415
Geológico, tiempo, 329
Geosmina, 415, 421
Geospirillum, 609
Geotérmico, hábitat, 456-57
Geotrichium, 944
Geovibrio, 439
Germicida, 697-98
Germinación, endospora,96, 98, 100
Giardia, 336-37, 479, 843
Giardia lamblia, 178, 862, 935-36, 948, 955
  genoma, 505
Giardiasis, 479, 843, 862, 935-37
Ginebra, 980-81
Gingivitis, 725
Glaciar, 154
Glándula sebácea, 721, 743
Gliceraldehído,
  fosfato deshidrogenasa, 122
Gliceraldehído-fosfato, 120-21-22, 555-57, 592-93
Glicerato, 592
Glicerato-1,3-PP, 584
Glicerato-3-P, 584
Glicerol, 45, 70, 338, 427
  diéter, 68, 69
  estructura, 161
  fermentación, 586
  producción comercial, 976
  soluto compatible 160-61
  tetraéter, 68, 69
Glicina betaina, 160-61
Glicina, 592
  código genético, 195
  estructura, 49
  fermentación, 584
  síntesis, 133
  síntesis purina, 134
Glicocalix, 91, 92, 728, 730
Glicol, 584
Glicolípido, 45
Glicolípido, antibiótico, 700
Glicolisis, 103, 120-22, 443
Glicoproteína, 45
  específica de virus, 526
  pared celular, 447
Glicosídico, enlace, 39, 43-45
  orientación alfa, 45
  orientación beta, 45
Glifosato, resistencia, 1006
Glioxilato, 586, 592
Glioxilato, cielo, 595-98
Gloeobacter, 418
Gloeocapsa, 418
Glomerulonefritis aguda, 871
Glucoamilasa, 973
Glucógeno, 44, 92, 119, 132, 555, 593
Gluconato-6-P, 584
Gluconeogénesis, 132, 443
Glucónico, ácido producción comercial, 975
Gluconobacter, 354, 368, 372, 608, 974
Glucosa-1 fosfato, 594-95
Glucosa-6-fosfato, 594-95
Glucosa-fosfato, 118, 121, 132, 369
Glucosa-fosfato deshidrogenasa, 814
  deficiencia, 918
Glucosa, 43-44, 132
  efecto, 219
  enantiómeros, 50
  fermentación, 121-22, 648
  isotermas, 972
  oxidasa aplicaciones industriales, 972
  permeabilidad de membranas, 70
Glucosamina sintasa, 681
α-Glucosidasa, 727
β-Glucosidasa, 727
Glucósido-C, 700
Glucosilación DNA, 243, 248
α-Glucosilglicerol, 160
β-Glucruonidasa, 727
Glutamato, 584
  código genético, 195
  estructura, 49
  fermentación, 584
  industria alimentaria, 970
  producción comercial, 970
  síntesis, 133
  soluto compatible, 160
Glutamato deshidrogenasa, 133
Glutamato sintetasa, 133
  adenilación, 210
  retroinhibida, 210-11
Glutamina, 682
  código genético, 195
  estructura, 49
  síntesis, 133
  sintetasa,133
Glutaminal-tRNA sintetasa, 133, 210, 682
Glutaminil-tRNA sintetasa, 199
Glutaraldehído, 698
GM-CSF, 761, 793
Golgi, aparato de, 475
Gonococo, *véase Neisseria gonorrhoeae*
Gonorrea, 730, 743, 811, 832, 844, 846, 856, 875, 890-92, 894
Gonotropina coriónica humana, 815
Gonyaulax, 488-90
Gradiente, 87, 88
Gradiente temporal, 87
Gram negativas, bacterias, 56, 58, 59, 74
  membrana externa, 79-81
  paredes celulares, 74, 76, 81
Gram negativos, bacilos aerobios facultativos, 375-79
Gram negativos, cocos, 381
Gram positivas, bacterias, 30, 31, 56, 58, 59, 74, 336, 353, 398, 418
  alto GC, 353, 411-415
  bajo GC, 353, 398-403, 408
  pared celular, 74-77, 81
  pared celular, síntesis, 140-41
Gram positivos bacilos, formadores de endosporas, 398
Gram positivos, cocos, características, formadores de endosporas, 403-8
Gram, Christiam, 18
Gramicidina, 403
Gran Lago Salado, 444-45
Grana, 473, 542, 545
Granzimas, 760
Gray (unidad de radiación), 692
Gremio, 625-26
Griffith, Fred, 18, 280
Grupo de ácido carboxílico, 48
Grupo sanguíneo, 818-19
Grupos de células en forma de V, 410
Grupos funcionales, 41
Grupos terroristas, armas biológicas, 864-65
GTP,
  en síntesis de proteínas, 201
  producción en el ciclo del ácido cítrico, 129
Guanina, 46, 47, 48, 171, 172
Gusano de Pompeya, 652-43
Gusanos tubículas, 640-42
Gvp, proteínas, 95

Hábitat, 1, 4, 448, 626, 628 *véase* también hábitat específicos y sus propiedades químicas sobre los microorganismos,
Haemophilus, 280, 283
Haemophilus ducreyi, 714, 890
Haemophilus haemolyticus, 302
Haemophilus influenzae, 65, 178, 281, 302, 492, 771, 772, 805, 819, 832, 853, 856, 860, 869, 879
  resistencia antimicrobiana, 714
  genoma, 502
Hafnia, 377
Haloanaerobium, 160, 445
Haloarcula, 446
Halobacterium, 32-34, 159, 266-67, 442-43, 445-47, 637
  NRC1, 178-79
Halobacterium salinarum, 160, 339, 446-48
Halobacteroides, 4
Halococcus, 79, 159, 443, 446
Haloferax, 446
Halófilo, 29, 33, 34, 138, 973
  extremo, *véase* Halófilo estricto moderado,
  pared celular, 79
Halófilos discretos, 159
Halogeometricum, 446
Halomonas, 354
Halorhodospira, 160, 354, 355, 356, 445
Halorhodospira halochloris, 67
Halorodopsina, 442, 448
Halorubrum, 446
Haloterrigena, 442
Halotolerancia, 138, 159
Hambre, 742
Hansen, enfermedad de, *véase* Lepra
Hansen, G. A., 875
Hansenula wingei, 477
Hantavirus, 843, 856, 860, 863, 908
Hantavirus, síndrome pulmonar, 843, 906, 908-909
Hapalosiphon, 418-19
Haploide, 25, 475
Hapteno, 748, 756
Hashimoto, enfermedad de, 775, 776
HAT medio, 813
Hayes, William, 281
HBLV, *véase* Virus linfotróficos de linfopcitos B humános HBLV, virus,
Heces, 727
Helicasa, 182, 276
Helicobacter, 354, 384, 386-87
Helicobacter pylori, 387, 725, 860, 886-87
  genoma, 499-500
Helicoides, virus, 235
Heliobacillus, 408, 598
Heliobacillus mobilis, 408
Heliobacter gestii, 408
Heliobacterias, 352, 408, 543, 547
Heliobacterium, 403-404, 408, 598
Heliobacterium modesticaldum, 23
Heliophilum, 403, 408, 598
Heliophilum fasciatum, 408
Heliorestis, 408
Heliothrix, 437
Helling, Robert, 18
Helminto, enfermedad infecciosa, 856
Hemaglutinación, 527, 812, 818
Hemaglutinina, 527, 883
Hemicelulosa, 653
Hemo, 123
Hemofilia, 851-2, 1004
Hemoglobina, 52
Hemoglobina A, 917
Hemoglobina S, 917-18
Hemolisina, 290, 401, 733, 735, 885
Hemólisis, 733, 735-36, 816, 819
α Hemólisis, 400, 870, 874
β-Hemólisis, 400
Hemorrágica, fiebre, 843, 860
Heno, fiebre, 773
Hepacivirus, 887
Hepadnavirus, 256, 535, 537-38
  genoma, 537
  replicación, 537
Hepatitis, 841, 843-44, 868, 887
Hepatitis A, 856, 887, 889, 939, 955
Hepatitis A, vacuna, 771, 858
Hepatitis A, virus, 524, 772, 832, 843, 888
Hepatitis B, 856, 887
Hepatitis B, vacuna, 771, 772, 858, 887, 888, 1001, 1003
Hepatitis B, virus, 233, 257, 258, 709, 809, 832, 843, 860, 888-889
Hepatitis C, 856-57
Hepatitis C, virus, 832, 843, 860, 888-889
Hepatitis D, 887
Hepatitis D, virus, 832, 843, 888
Hepatitis E, virus, 832, 843, 860, 888
Hepatitis G, 887
Hepatitis G, virus, 888-89
Hepatitis virus, 825
Hepatocelular, carcinoma, 257
Hepatovirus, 887
Heptacloro, 668
Herbaspirillum, 384
Herbicida,
  biodegradación, 668-69
  preemergente, 1006
  resistencia, 1006
Herpes simplex, virus, 256, 531, 836, 890, 894
  tipo I, 894
  tipo II, 895
Herpesvirus, 256, 531-33, 549, 709, 832
  infección latente, 523
  tardío, mRNA, 532
  temprano retrasado mRNA, 531-32
  temprano, mRNA, 531-32
Herramientas de cultivo, 615
Herramientas genéticas moleculares, 639
Hershey, A. D., 247
Hesse, Fannie, 15
Hesse, Walter, 15
Heterocisto, 95, 352, 420, 598, 683
Heterodisulfuro reductasa, 579
Heteroduplex, región, 277
Heterofermentativo, bacterias del ácido láctico, 352, 400
Heteroláctica, fermentación, 585
Heterólogo, antígeno, 757
Heterotrofo, 28, 131
Hexaclorofeno, 698
Hexosa, 43, 44, 132
  fermentación, 584
  metabolismo, 132, 601-3
Hexulosa fosfato sintetasa, 592-93
Hexulosa-6-P isomerasa, 592-93
Hfr, cepa de E. coli, 281, 288, 293, 316
  formación y comportamiento, 293-95
  transferencia orientada de DNA, 294-95
HhaI, 302
Hialurónico, ácido, 733, 735
Hialuronidasa, 733, 735, 886
Hibridación, 174, 265, 304
  ácido nucleico, 830
Hibridoma, 813-15
Hídrico, radical, 692
Hidrocarburos, 416, 589, 667
  metabolismo anaróbico, 648-49
  oxidación, 589-590
  producción microbiana, 667
  transformaciones, 666-67
Hidrocarburos, microorganismos oxidadores de, 666-67
Hidrocortisona, producción comercial, 972
Hidrofobia, 907
Hidrogenasa, 105, 364, 472, 540, 559, 571, 573, 583-84
Hidrógeno,
  bacterias de, véase también Bacterias oxidadoras de hidrógeno

    - cultivos de enriquecimiento, 608
    - autotrofia en, 560
  - bacterias oxidadoras de, 363-65, 559
    - características, 365
    - ecología, 364
    - energética, 363
    - sulfataras hidrotermales 641
    - fisiología, 364
  - cianuro, tierra primigenia, 323
  - donador de electrones, 444, 465-66, 560, 574, 580, 582, 633, 647
  - enlace, por puentes de, 39,-41
    - DNA, 40, 47, 48, 172, 174
    - proteina, 40, 51
    - agua, 39-40
  - estructura atómica, 39
  - fuente de energía, 130
  - macronutriente, 104
  - oxidación, 559-560
  - peróxido de, 164, 165, 475, 698, 752-53
    - esterilización fría, 694
  - producción por células primitivas, 327
  - producto de fermentación, 376, 584, 587, 646-47
  - sulfuro de, 29, 407
    - donador de electrones, 551, 560
    - fuente de energía, 130
    - producción a partir del sulfato, 571-73
    - ciclo del azufre, 656-57
    - ensayo para la producción de, 803-805
- *Hidrogenobacter*, 438
- Hidrogenosoma, 469, 472, 653
- Hidrólisis del almidón, 594
- Hidrolíticas, enzimas, 81
- Hidrotermales, 152, 155, 439, 454, 455-56, 460-63, 4765-67, 625, 639-44
  - calientes, 639-40
  - microorganismos, 641
  - nutrición de los animales, 641-42
  - templadas, 639-40
- Hidroxamato, 105, 106
- p-Hidroxibenzoico ácido, 676
- Hidroxiclorofila a, 552
- Hidroxilamina, 272, 360, 566
- Hidroxilamina, oxidoreductasa, 566
- Hidroxilasa, 589
- Hidroxilo, radical, 164, 273, 692, 753
- Hidroximetilcitosina, 248
- Hidroxipiruvato, 592
- Hidroxipropionato, ruta, 557
- Hielo, 43
- Hielo de mar, 153-54
- Hierro, 374, 583, 731
  - bacterias oxidadoras de, 360-63, 563-65, 658-70
    - acidofílicas, 564
    - fototrofas anoxigénicas, 565
    - energía de hierro ferroso, 564
    - sulfataras hidrotermales, 641
    - a pH neutro, 563-64
  - citocromos, 124
  - en la naturaleza, 104
  - función celular, 105
  - medio de cultivo, 104
  - oxidación, 455, 559, 563-65, 659
  - producción de toxina diftérica, 736
  - reducción, 130, 658
  - reducción de hierro férrico, 579-80
  - requerimiento celular, 104-5
- Hierro, ciclo, 658-600
- Hierro, óxido, 388
- Hierro, respiración, 568
- Hifa cenocítica, 482
- Hifas,
  - bacterianas, 388-90
  - cenocíticas, 479
  - estreptomicetos, 410
- *HindIII*, 302
- Hiperinmune, antisuero, 771
- Hipermutación somática, 786-87
- Hipersalino, lago, 444
- Hipersensibilidad, 748, 773
  - inmediata, 773-75
  - retardada, 773, 774-75
- Hipertermófilo, 29, 138, 152, 155-56, 337, 352, 442, 453-60, 557, 973
  - adaptaciones moleculares, 156-57
  - anaerobios estrictos, 458-59
  - aplicaciones biotecnológicas, 157
  - área volcánica submarina, 460-61
  - características, 459
  - evolución, 465-66
  - hábitat volcánico, 458
  - lípidos, 464
  - macromoléculas, 463-64
  - quimiolitotrofo, 458
  - quimioorganotrofo, 453, 458
- Hipocloroso, ácido, 753
- Hipolimnion, 634
- Histamina, 774
- Histidina,
  - código genético, 195
  - estructura, 49
  - fermentación, 584
  - síntesis, 133
- Histidinol, 133
- Histona, 175-76, 212-13, 453, 464
  - SV40, 529
- *Histoplasma capsulatum*, 832, 897, 922-23
- Histoplasmosis, 775, 832, 896-97, 922-24
- HIV inmunoblot, 828-29
- HIV, 242, 258, 260, 709, 716, 743, 809, 820, 832, 844, 850, 856, 861, 890, 896-900 véase también SIDA
  - detección de la infección, 903
  - *gag gen*, 833
  - inhibidor de proteasas, 901
  - interacctiones con células T, 897-99
  - receptor de superficie celular, 897-98
  - resistencia a antivíricos, 901
  - test de aglutinación, 903
  - HIV-1 genoma, 535-37
- HIV-ELISA, 824, 828
- Hoffman, E., 875
- β-hoja, 51-52, 154
- Holdfast, 391
- Holoenzima, 187
- *Homo sapiens, genoma*, 504
- Homoacetogénesis, 540
- Homoacetogénica, fermentación, 585
- Homoacetogénicas, bacterias, 572, 646, 647
- Homocisteína, 584
- Homofermentativas, bacterias del ácido láctico, 352, 400
- Homoláctica, fermentación, 585
- Homólogo, antígeno, 757
- Homoserina lactonas, 629
- Homoserina, 584
- Hongos, 23, 35, 336, 469, 478, 481-85
  - características, 482
  - clasificación, 483
  - enfermedad infecciosa, 856
  - filamentosos, 479-80
  - filamentosos, véase Mohos
    - control de crecimiento, 710-11
  - hábitat, 481
  - micorrizas, 625, 673-75
  - mucosos, 35-36, 336, 469, 485-86
    - celulares, 485-86-87
    - hábitat, 486
    - unicelulares, 485
  - paredes celulares, 481-85
  - patogénicos, 921-24
  - podredumbre de la madera, 483
  - rumen, 652-53
  - tolerancia al ácido, 158
  - unicelulares, 483-84
- Hooke, Robert, 9
- Hopanoide, 68
- Hops, 980-81
- Horizonte A, 631
- Horizonte C, 631
- Hormogonio, 421
- Hormona estimulante del folículo, 1001
- Hospedador, 720, 848-50
  - a hospedador transmisión, 843-44, 847
    - directa, 846
    - indirecta, 846
  - coevolución de hospedador y parásito, 848-50
  - defensa, *véase* también sistema inmune;
    - anatómica, 742-44
    - dieta y, 742
    - específica, 741
    - estrés y, 742
    - inmunidad y edad, 742
    - no específica, 741-43
    - resistencia natural, 741-43
  - entrada del patógeno, 729-30
  - virus, 232-233, 237-38
  - especificidad del patógeno, 730
- Hospital, patógenos, 853
- Hospitalario, ambiente, 849, 952-53
- Humana, genética, 1008-1010
- Humana, virus de la inmunodeficiencia *véase* HIV
- Humana, virus de la leucemia, 257
- Humano, comportamiento: contribución de la emergencia de patógenos, 858-60
- Humano, papilomavirus, 832, 834, 861, 890
- Humano, virus linfotrófico de células T, 861
- Humanos, antígenos leucocitarios, 758, 782
- Humo negro, 454, 462, 463, 465, 625, 639-40, 642-43
- Humoral, inmunidad, 748, 755, 761
- Humus, 644
- *Hydrogenobacter flava*, 365
- *Hydrogenobacter thermophilus*, 365
- *Hyperthermus*, 457
- *Hyphomicrobium*, 354, 387, 389-90, 609

- **Icosaédrico, virus,** 235, 236, 514-16
- Ig, *véase* Immunoglobulina Ii, péptido,
- *Ignicoccus*, 458, 462
- *Ignicoccus islandicus*, 462
- IL, *véase* Interleucina Ileon,
- Íleon, 725-26
- Impétigo, 870, 885
- Impulsor, 961-62
- Inactivación insercional, 309
- Incidencia de enfermedades, 839, 840
- Inclusión, 92-94, 532
- Incompatibilidad, grupo, plásmidos, 287
- Incubación, periodo, 841
- Indicador, gen, 614 987, 995-96
- Indicador, organismo, 928
  - indice, 855
- Indicadora, moléculas, 830
- Indinavir, 709
- Indirecta, hospedador-hospedador transmisión, 846
- Indirecta, inmunotransferencia, 848
- Indirecto, ELISA, 824-26
- Indirecto, fluorescente, anticuerpo, 821
- Indol, test, 804
- Inducción, 215-17
  - bacteriófago lambda, 254
  - profago, 251
- Inductor, 216, 217, 993-994, 999
- Industria de la madera, 699
- Industria de la piel, 699
- Industria eléctrica, 699
- Industrial, agua usada, 929
- Industrial, microbiología, 17, 957
- Industrial, microorganismos, 958-59
  - cepas altamente productoras, 967
  - manipulación genética, 959
  - propiedades de microorganismos útiles, 959
  - superproducción, 970
- Industrial, proceso,
  - bioconversión, 971-72
  - control y monitorización, 961-62
  - desinfectantes, 699
  - fermentaciones a gran escala, 961-62
- Industriales, productos, 959
  - formación, 960-62
- Industriales, solventes, 669
- Infantil, botulismo, 669
- Infección, 720-21, 841
  - aguda, 839
  - crónica, 839
  - cruzada, 852
  - de heridas, 743
  - cultivo, 800-801
  - del tracto urinario, 370, 378, 704, 729, 730, 742, 799, 832, 853
  - respiratoria, 841
    - bacteriana, 869-77
    - nosocomial, 853
  - sistemática, 732
    - vírica 879-84
- Infecciones genitales, 856
- Infecciones reemergentes, 839, 858-63
- Infecciosa, enfermedad, 696
  - ciclos, 850
  - cuadros clínicos, 841-42
  - emergentes, 839, 958-60
  - hepatitis, *véase* Hepatitis A
  - inmunidad, 769-71
  - mononucleosis, 531
  - mortalidad en USA, 7
  - mortalidad, 839, 841, 857
  - reservorio, 842-45, 854
  - resurgente, 839, 858-60
- Infecciosas, gotas, 869
- Infertilidad masculina, 775
- Inflamación, 720, 743-44
- Influenza, 742, 832, 844, 858, 861, 881-83
  - epidémica, 528
  - pandémica, 883-84
- Influenza, vacuna, 771, 884, 1004
- Influenza, virus, 237, 242, 255, 526-28, 709, 812, 836, 844, 869, 882-83
- Información, flujo,
  - biológico, 168-69
  - pasos, 169-70
- Información, macromolécula de, 169
- Ingeniero bioquímico, 963
- Inhibición, 688
- Inhibición por retroalimentación, 207-11, 970-71
- Iniciación, complejo, 201
- Iniciación, factor, 201
- Iniciador, 168, 305, 306, 618, 619, 659-660
- Iniciadores proteicos, 186
- Injerto, rechazo, 783
- Inmediata, hipersensibilidad, 773-74

Inmediato, temprano mRNA, herpesvirus, 531
Inmoglobulina M (1gM), 763, 765-69, 781, 889
Inmovilizadas, células, 973-75
Inmovilizados, enzimas, 958, 973-75
Inmune, enfermedad, 773-77
Inmune, especificidad, 748
Inmune, sistema,
  células y órganos, 749-51
  evolución, 780-81, 787
Inmunidad activa, 769-700
  artificial, 769-770
  natural, 769
Inmunidad de grupo, 839, 549-50
Inmunidad especifica, 748-49
Inmunidad inespecífica, 748-54
Inmunización, 748, 755, 767, 769-71
  control de epidemias, 854-56
Inmunización frente al SIDA, 901-903
  partículas intactas muertas, 901
  vacunas de subunidades, 901
  virus atenuados, 901
  nuevas estrategias, 771-72
  programa para niños, 771
  programas de intervención, 862-63
  ruta de administración, 757
  SIDA, 901
  tétanos anatoxina, 924
  título de anticuerpos, 811
Inmunoblot, 304, 797, 812, 828-30, 903
  directo, 828
  HIV inmunoblot, 828-30
  indirecto, 828
Inmunodiagnóstico, 810-30
  anticuerpos monoclonales, 812-16
  en el embarazo, 815
  ensayos de orina para detectar drogas, 814
Inmunodiagnóstico, virus, 825
Inmunodifusión, 817-19
Inmunoelectrónica, microscopía, 820
Inmunofluorescencia, test, 812
Inmunógeno, 756-57, 770
Inmunoglobulina (Ig), 763-69, 780
  afinidad, 786-87
  avidez, 766
  cadena ligera, 764-65, 784-85
  cadena pesada, 764-66, 784-85
  genética, 785-87
  región hipervariable, 780, 784
  región variable, 784-85, 816
  superfamilia de genes, 780-81
  valencia, 766
Inmunoglobulina A (1gA), 763, 766
  secretoria, 766
Inmunoglobulina D (IgD), 763, 766
Inmunoglobulina E (1gE), 763, 766 773
Inmunoglobulina G (IgG), 763-65, 767, 768, 781
  cadena ligera, 764
  cadenas posadas, 764
  estructura, 763-64
  sitios de unión al antígeno, 764-65
Inmunología, 17
Inmunológica, memoria, 748, 749, 755, 767, 811
Inmunidad, 748, 810,
  a enfermedades infecciosas, 769-70
  activa, 769-70
  del lisógeno a superinfecciones, 251, 286
  especifica, 748-49, 755-56
  humoral, 748, 755, 761
  mediada por células, 748, 755, 761-62, 774-75, 810
  no-específica, 748-49, 751-55
  pasiva, 770, 771
Inóculo, 109
  enriquecimiento, 607-609
Inosina, 198
Inosínico, ácido, 133-34
Insecticida, 854
  biodegradación, 668
Insecto,
  repelente, 912, 915
  reservorio, 854
  resistencia, 1006-1007
  vector, 838
Insectos,
  espiroplasma, 410
  patógenos, 404-407
  Wolbachia infection, 383
Inserción, 271, 314-15 *véase* también Microinserción
Inserción, secuencia (IS), 179, 271, 293, 297, 298, 301
  IS2, 298
  IS50, 298
In silico técnicas, 494, 498, 508
In situ transcripción inversa, 616-17
Insulina, 8, 52, 827, 1001-1003
  proceso de prepoinsulina, 211-12
Int gen, 254
Integración, bacteriófago, 253-54
Integrasa, 254, 258
Integrón, 301
Inteína, 212, 503
Interacciones hidrofóbicas, 40-41
Interacciones hospedador-parásito, 721-22
Intercalación,
  crecimiento de la pared celular por, 388
Intercalante, agente, 272
Interespecies, transferencia de hidrógeno, 587
Interfase aceite-agua, 667
Interferón, 688, 708-10, 1007
Interferón-alpha, 793-95, 882
Interferón-gamma, 753, 785
Intergénica, región, M13, bacteriófago, 495
Interleucina (IL), 748, 793
Interleucina -1 (IL-1), 793-94
Interleucina -2 (IL-2), 793-94
Interleucina -4 (IL-4), 763, 793-94
Interleucina -5 (IL-5), 755, 785
Interleucina -8 (IL-8), 755, 785
Interleucina -l0 (IL-10), 793
Interleucina -12 (IL-l2), 793
Intermitente, fiebre, 744
Interruptor genético, lambda, 253
Intestinal, gas, 727
Intestino delgado, 725-26
  biota normal, 725-26
  enterotoxina, 738-40
Intestino grueso, 724-26
  biota normal, 725-26
Intracelular, parásito, 734, 810
  estricto, 31, 32, 381-93
Intrón que se autoprocesa, 193
Intrón, 168, 170-71, 178, 193-93, 255, 340, 497, 506, 995, 997
  autoprocesados, 193-94
  cloroplasto, 505
  en procariotas, 178
  SV, 530
Invasión por patógenos, 729, 731
Invasividad, 720, 732-33
Inversa (reversa), girasa, 176, 177
Inversa (reversa), transcriptasa, 236, 245, 250, 718, 896, 898, 997
  actividades enzimáticas, 259-60, 535
  síntei̇s del cDNA a partir de mRNA aislado
  virus utilizados, 534-38
Inversión, 271
Invertasa, 593, 595, 972
Invertidas, repeticiones en el DNA, 173, 191, 213, 220, 299
Invertidas, repeticiones terminales de DNA, 298, 299
Inv genes, 734
In vitro, recombinación, 307
Iodo, solución, 698
Ionizante, radiación,
  esterilización, 692-93
  fuentes, 692
  mutagénesis, 272, 273
IPTG, *véase* Isopropiltiogalactósido
Iridovirus, 256
IS, *véase* Secuencia de Inserción
Isobutirato, 407
Isocitrato liara, 595-96
Isocitrato, 129, 595-96
ISOleneina,
  código genético, 195
  estructura, 49
  fermentación, 584
  síntesis, 133
Isómero, 49-50
Isómeros ópticos, 49
Isoniazida, 703, 836
Isopreno, 68
Isopropanol, 406
Isopropiltiogalactósido (IPTG), 216
β-Isorenierateno, 547
Isotópico, fraccionamiento, 621-23
Isotópico, método de medir la actividad microbiana, 620-23
Isótopos estables, 621
Isovalerato, 407
Itacónico, ácido, producción comercial, 975
Itraconazol, 710-711
Ivanowsky, D., 522

J cadena, 765-66
J gen, 785
Jacob, Francois, 18, 281
Jamón, 945
Jarosite, 659
Jarra de anaerobios, 163,
Jaundice, 868, 888-889
Jejuno, 725-26
Jenner, Edward, 18
Jerez, 978
Jock, prurito, 922
Juvenil, diabetes, 775-76

K antígeno, 378
Kanamicina, 701, 706, 712, 807
  producción comercial, 964
Kaposi, sarcoma de, 896-97
KDGP, 369
KDGP aldolasa, 369
KDO, *véase* Cetodesoxioctonato Ketoconazol,
Khorana, H. Gobind, 18
Kilobase, pares, 172
Kilojulio, 110
Kingella, 374
Kirby-Bauer, método, 807
Kitasato, S., 18, 875
Kitasatoa, 415
Klebs, T. A. E., 875
Klebsiella, 226, 289, 301, 377-78-79, 585, 598, 721, 730, 799, 801, 803-5
Klebsiella pneumoniae, 379, 602-3, 798, 853, 927, 965
Klett, unidades, 148, 149
Kluyveromices, 981
Knallgas, reacción, 363
Koch, postulados de, 12, 13
Koch, Robert, 12-14, 17, 413, 775, 874-75, 935
Kohler, Georges, 18
Korarchaeota, 336-37, 442-43, 465-66
Kurthia, 416
Kuru, 261

Laboratorio clínico, seguridad, 809-10
Laboratorio, fermentado, 963-64
Laboratorio, infección, 809
lac operón, 213, 219-20, 993
Lac permeasa, 72
lac promotor, 495
lac represor, 213, 994
Lachnospira multiparus, 652-53
β-Lactamasa, 706, 711-13
β-Lactámico, antibiótico, 688, 700, 705-7, 715, 958
Lactasa, aplicaciones industriales, 972
Lactato, 652-53
  deshidrogenasa, 121, 122
  donador de electrones, 582
  fermentación, 411-2, 584
  producto de fermentación, 121, 123, 376, 399, 400, 411, 584-585
Lactobacillus, 106, 401, 402-3, 585, 609, 721, 726, 944
Lactobacillus acidophilus, 402, 728-29
Lactobacillus brevis, 402, 693
Lactobacillus delbrueckii, 402
Lactobacillus plantarum, 105
Lactococcus, 400, 944
Lactoferrina, 731
Lactona de homoserina acilada (AHL), 224
Lactoperoxidasa, 723
Lactosa, 968
  incorporación, 72
  metabolismo de la, 593, 595
LacZ gen, 995
LacZ sistema, 497-98
LacZ' gen, 495
Lager, cerveza, 980-81
Lago, 634-35
  contenido en oxígeno, 634
  estratificación, 634
  eutrófico, 635
  recambio, 634
Lambda, bacteriófago, 234, 247, 250-55
  cambio genético, 253
  ciclo de vida, 251
  crecimiento lítico, 254
  fagos modificados, 310
  genoma, 251
  integración, 253-54
  lambda dgal, 285
  lisis vs., 253
  lisogenización, 284-85
  lisogenizado, 284-85
  mapa genético, 252
  morfología, 251
  promotor, 993-94
  replicación, 252
  represor, 213, 252, 253-54, 994
  transducción, 284-85
  vector de clonación, 310-11, 496
  vía lítica, 251-53
Lamelas, membranas fotosintéticas, 418
Laminarina, 488, 593
Laminarinasa, 593
Lamivudina (3TC), 711, 901
Lamprobacter, 356
Lamprocystis, 356
Lancefield, grupos de, *Streptococcus*, 400
Landfill, 649, 670-71
Landsteiner, Karl, 18
Larvicida, 404
Lassa, fiebre de, 709, 861
Latente, infección,
  herpesvirus, 531
  virus animales, 256
Latente, periodo de multiplicación viral, 241
Láurico, ácido, 80
Lavado de manos, 809

LD_{50}, 732
Leche, pasteurización, 691-92, 842, 854, 877
Lecho capilar, 749, 751
Lecitinasa, 733, 735-36
Lectina, 679
Lectura, cambios en la fase de, 270
Lectura, marcos de, 196
  abierto, 196, 316, 494, 497-500
Lederberg, Joshua,18, 280
Leeuwenhoek, Antonio van, 9, 18, 383-84
Leghemoglobina, 625, 677-78
Legionario, enfermedad del, 707, 821-22, 838-39, 843, 856, 858, 860
Legionella, 354
Legionella pneumophila, 707, 821-22, 857, 832, 843, 858, 860, 869-70, 938-39
Legumbre, 7-8, 598, 607, 652, 682, 684
  cooperación genética con *Rhizobium*, 683
  nódulos de raíz, 677-78
  nódulos de tallo, 682-83
Leishmania, 479
Leishmania donovanii, 832
Leishmania major, 505
Leismaniasis, 479, 832, 841
Lepra, 775, 856, 875, 877
Leptonema, 433-34
Leptospira, 433-34
Leptospira biflexa, 434
Leptospira interrogans, 434
Leptospirillum ferrooxidans, 564, 659, 663, 664
Leptospirillum, 443
Leptospirosis, 433-34
Leptothrix, 354, 387-89, 563, 659
Letal
  dosis, 693
  factor (LF), 733
Letárgica, enfermedad, 410
  T-celular del adulto, 283
Leucemia, 861
Leucina,
  código genético, 195
  estructura, 49
  fermentación, 584
  síntesis, 133
Leucocidina, 733, 735, 754, 886
Leucocitos, 720, 744, 748, 749, 750
Leuconostoc, 106, 401, 401, 585, 944
Leuconostoc mesenteroides, 107-8, 595
Leucothrix, 354
Leucothrix mucor, 60, 75
Levadura, 8, 469, 481, 483-84, 585
Levadura de cerveza, 485
Levadura seca activa, 977
Levaduras de fermentación en superficie, 980
Levanos, 402
Licopeno, 547
Licor de maceración del maíz, 959-60
Líder, cadena, 182-84
Líder, secuencia, 220-22
Lignina, degradación, 364, 416, 483-84, 649, 653
Limulus, ensayo para endotoxina, 740-41
Lincomicina, 701, 964
Lindano, 668
Línea de identidad parcial, 817
Linfa, 748-49
Linfático, nódulo, 749, 767, 790-91
Linfático, sistema, 749, 751
Linfocina, 784
Linfocitos, 748-50
  reordenamiento génico, 785
Linfogranuloma venéreo, 424, 890, 894
Linfoides, células precursoras, 750
Linfoma de Burkitt, 257-58, 531, 832
Liofilización, 943
Lipasa, 596-97, 735, 752, 886
  aplicaciones industriares, 972
Lipídica, bicapa, *véase* bicapa de fosfolípidos
Lipídica, monocapa, 68, 157
Lípido A, 80, 81, 740
Lípidos, 3, 39, 42, 43
  amfipáticos, 46
  Archaea, 68, 338, 340
  complejos, 45-46
  con enlaces éster, 68, 338
  con enlaces éter, 68, 338
  de *Bacteria*, 338, 340
  de *Eukarya*, 338, 340
  estructura, 45-46
  hidrólisis, 596-97
  hipertermófilos, 464-65
  metabolismo, 596-97
  propiedades químicas, 45
  síntesis, 133-34
Lipoglicano, 409, 453
Lipoico, ácido, 106
Lipopolisacárido (LPS), 56, 79, 81
  endotoxina, 740-41
  química, 79-81
Lipoproteína, complejo, 80, 81
Lipoteicoico, ácido, 77
Liquen, 36, 421, 491, 625, 672-73
Liquénico, ácido, 673
β Lisina, 743
Lisina,
  código genético, 195
  estructura, 49, 76
  fermentación, 584
  industria alimentaria, 970
  peptidoglicano, 74
  producción comercial, 970-71
  síntesis, 133
Lisis, 77, 78, 238, 240, 241, 688, 767, 769, 816
  autolisis, 141
  fase de muerte, 145
Lisis, proteína, fago MS2, 514
Lisogenia, 250-51, 253, 286
Lisogenización por lambda, 253
Lisógeno, 232, 251
Lisosoma, 475, 529, 752, 753
Lisozima, 77-78, 79, 113, 236, 723, 742, 743, 1001
  T4, 249
Listas, 489
Lister, Joseph, 12
Lister, Robert, 18
Listeria monocytogenes, 761, 832, 948, 953-54
Listeria, 403, 944
Listeriosis, 403, 832, 856, 943, 953-54
Lítica ruta, 232
  bacteriófago lambda, 251-53
  bacteriófago, 520
  virus animales, 256
Lítico, ciclo, 232
Lixiviado microbiano, 625 659, 661-64
  cobre 661-663
  oro, 663-64
  uranio, 663-64
Lockjaw, 738, 924
Lodo-125, radioinmunoensayo, 827
Lopinavir, 709
Lowenstein-Jensen, medio de, 413
LPS, *véase* Lipopolisacárido
Luciferasa
  bacteriana, 380-81
  gen, 224, 995-96
Lupus eritematoso sistémico, 773
Luria, Salvador, 18, 247
Luteolina, 681
Lux operon, 224
Luz, fuente de energía, 28
Lyme, enfermedad, 105, 433, 435, 844, 856, 858, 859-60, 863, 906, 912-15
  detección, 913-15
  incidencia y geografía, 913-14
  patogénesis, 913
  prevención, 913-15
  salpullido, 913
  transmisión, 912-13
  tratamiento, 913-14
Lyme, vacuna, 915, 1001
Lyngbya, 418

M13 bacteriófago, 247, 517-18
  mutagénesis dirigida, 314
  vector de clonación, 494-496, 989
MacConkey, agar, 800
Macerado de maíz, 482
Macleod, Colin, 18, 280
Macrocisto, 487
Macrófagos, 748, 750, 753
  activación, 761-62
  CD4, 897
Macrólido, antibiótico, 700, 707
Macrólidos, 705
Macromolécula, 3, 22, 39-53,
  ácidos nucleicos, 46-48
  aminoácidos, 48-50
  carbono como componente principal, 41
  enlaces químicos, 39-42
  generalidades, 42-43
  hipertermófilos, 463-64
  inmunógeno, 756-57
  lecalizacion en la célula, 43
  lípidos, 45-46
  polisacáridos, 43-45
  portadora de información, 169
  proteínas, 50-53
    desnaturalización 52-53
    estructura de orden superior, 52-53
    estructura de orden primario y secundario, 50-52
  tierra primigenia, 324
Macronúcleo, 480
Macronutriente, 103, 104-5
Maduración, en multiplicación viral, 418
Maduración, proteína de, (falto MS2), 514
Magnesio, 104
Magnetosoma, 56, 92-94, 384
Magnetospirillum magnetotacticum, 93, 384, 385
Magnetotaxis, 92, 384
Maíz, podedumbre, 482
Malaria, 479, 481, 743, 827, 832, 841, 844, 845, 849, 854, 856-57, 862, 906, 915-18, 1004
  diagnosis, 916-17
  endémica, 917
  epidemiología, 915-16
  erradicación, 917
  evolución bioquímica en humanos, 917-18
  patogénesis, 915-16
  tratamiento, 916-17
  vacuna, 1007
Malation, 668-69
Malato, 129, 592
  bioquímica de la fijación de nitrógeno, 682
  fermentación, 584
  metabolismo, 595-96
  sintetasa, 595-96
Maligno, tumor, *véase* Cáncer
Mallon, Mary, 845
Malonato, 133, 586
Malonil-ACP, 133, 134
Malonomonas rubra, 586
MALT, *véase* TLAM (Tejido Linfoide Asociado a Mucosas)
Malta (cerveza), 980
Maltosa, metabilismo, 509
Maltosa, proteína activadora de, 218
Maltosa, regulón, 217-18, 225
Malyl CoA, 592
Mamífero,
  aislamiento vía mRNA, 997-98
  aislamiento vía proteína, 998-99
  clonación y expresión en bacterias, 996-1000
  proteína de, genéticamente manipulada, 1000
  síntesis de un gen completo, 999
Mamíferos, células de, vectores de clonación, 990, 995
Manantiales ricos en azufre, 456
Manganeso,
  bacterias oxidadoras de, 387
  función celular, 105
  reducción, 580-81
  sulfataras hidrotermales, 641
Manitol, 161
Mannan, 490-92
Mantequilla, 8, 400
Mapeo óptico, 304
Mar Muerto, 444
Marburg, virus, 860, 862
Marco de lectura abierto (ORF), 196, 316, 494, 497-98, 503, 505
Marcrotetrólidos, 700
Mareas rojas, 490
María Tifoidea, 845
Marina, sal, 445
Marisco,
  cólera, 935
  virus hepatitis A, 888
Más probable, número (MPN) test de coliformes, 607, 611-12
Masas microbianas, 323, 621
Mastigophora, 479-80
Mastitis, 870
MAT, locus, 475-76
Matraz de laboratorio, 963
Matriz mitocondrial, 471-72
Maxam y Gilbert, procedimiento de secuenciación, 305
Máxima temperatura, 151
McCarty, Maclyn, 18, 280
McClintock, Barbara, 18
MCP, *véase* proteína receptora de gupos metilo en la quimiotaxisme genes,
Mcrocystis, 95
Médica, microbiología, 17
Médico, implante, 629-30
Médicos, suministros, esterilización por radiación, 693
Medidas de turbidez, 148
Medio definido, 103, 107
Medio enriquecido, 797
Medioambiente, 626
  efecto sobre el crecimiento, 151-65
Médula ósea, 750, 766
Megapares de bases, 172
Megasphaera, 552
Megasphaera elsdenii, 653
Meiosis, 25, 26, 469, 475-76
Mejillones, metanotrofos como simbiontes de, 367-68
Melioidosis, 371
Melittangium, 392
Melittangium erectum, 392
Membrana externa,
  bacteria gran negativa, 79-81
  cloroplasto, 473
  Deinococcus, 435
  Ignicoccus, 435
  Mitocondria, 471-72
Membrana interna,
  cloroplasto, 473
  mitocondria, 471-72
Membrana roja, 447
Membrana, ensayo de filtro,
  coliformes, 928
  sonda de ácido nucleico, 831

Membrana, filtración, 694-95
Membrana, proteína,
  de transporte, 70, 71
  integral, 66
  periférica, 66
Memoria, células de, 750, 767
Meninges, 878
Meningitis, 399, 832, 836, 841, 843, 855, 860, 861, 868, 875, 885
  aséptica, 878
  diagnosis, 878
  epidemiología y patología, 878
  otras causa, 879
  prevención y tratamiento, 878
Meningitis, vacuna, 771
Menopausia, 729
Mensajero RNA (mRNA), 47, 168, 169, 170, 171
  clases, 531-32
  cola de poli-A, 193, 255, 340
  específico de virus, 244
  estructura cruciforme, 221-22
  eucariótico, 192
  interacciones rRNA, 202
  monocistrónico, 170
  policistrónico, 170, 191-92, 201, 222, 229, 255, 316, 522
  procariótico, 191-92
  procesamiento de RNA, 193
  sitio de unión al ribosoma, 201
  traducción, 200-202
  transcripción, 187-92
mer genes, 665
Mer, proteínas, 665
7-Mercaptoheptanoiltreonina fosfato (HS-HTP), 576-77
Mercúrico, dicloruro, 698
Mercúrico, reductasa, 665
Mercúrico, resistencia, 665
Mercurio, ciclo, 664-65
Meridiploides, 295
Merismopedia, 418-19
Meromíctico, lago, 355
Merozoito, 916
Meselson Mathew, 18
Mesófilo, 138, 152
Mesoplasma, 409
Mesorhizobium, 677
Mesorhizobium loti, 678
Mesostigma viride, 505-6
Metabólica, cooperación, 628
Metabólica, diversidad, 627
Metabolismo, 1, 3, 4, 103,
  catabólico, 568-69
  complementario, 628
  de asimilación, 558-69
  en células primitivas, 326-27
Metabolismo asimilador, 568-69
  reducción de nitrato, 569
  reducción de sulfato, 571-72, 656
Metabolismo desasimilador, 568-69
  reducción de nitrato, 569-70, 655
  reducción de sulfato, 571-72, 656
Metabolito,
  primario, 958, 960-61
  secundario, 958, 960-61
Metaclorobenzoato, 582
Metal reductasa, 577, 579
Metal, industria de, 699
Metallosphaera, 458-60
Metano, 8
  ciclo del carbono, 645-47
  composición isotópica, 622
  liberado a la atmósfera 649
  monooxigenasa, 366, 367, 591-92
  oxidación anóxica 648-49
  oxidación, 365-66, 590-92
  producción en rumen, 651-52
  producto de fermentación, 587
  tierra primitiva, 323
Metanocondroitina, 448-49
Metanofenazina, 579
Metanofurano, 576-77
Metanogénesis, 448, 540, 573-74, 576-78, 587, 646-50
  autotrófica, 578
  energética, 574, 579
  coenzimas redox, 576-77
  conservación de la energía, 579
  de compuestos metilo y acetato, 577-78
  hábitat metanogénicos, 649
  océanos, 649-50
  reducción del dióxido de carbono a metano, 577
Metanogénica, fermentación, 585
Metanógeno, 33, 442, 444, 472, 573-75
  acetotrófico, 449-50, 575
  árbol filogenético, 337
  Archaea, 448-9
  autotrófico, 578
  características, 449
  ciclo del carbono, 645-47
  coenzimas, 576-577
  diversidad, 448-49
  fisología, 448-49
  hábitat, 448-49
  reducción del dióxido de carbono a metano, 577
  rumen, 653
  sustratos de tipo co_2, 449-50
  sustratos metilo, 449-50
  sustratos, 449-50
  tratamiento de aguas residuales, 930
Metanol, 366, 389-90, 449-50, 592
  fermentación, 584
  transformación a metano, 477-78
Metanotiol, 658
Metanotrofo, 352, 365-68, 540, 590, 593, 666
  aislamiento, 367
  asimilación de compuestos monocarbonados,
  bacterias formadoras de nitroso, 367
  características, 366
  ciclo de la ribulosa monofosfato, 366
  ciclo del carbono, 665-66
  clasificación, 366-67, 592
  ecología, 367
  membranas internas, 366-67
  oxidación de metano, 365-66
  ruta de la serina, 366
  simbiontes de animales, 367-68
Metástasis, 256
Metazoos, 322, 64243
Metchnikoff, Elie, 18
Methanobacterium, 78, 79, 336, 443, 448-50, 649
Methanobacterium formicicum, 162, 577
Methanobacterium thermoautotrophicum, 283
Methanobrevibacter, 449, 649
Methanobrevibacter arboriphilus, 448-49
Methanobrevibacter ruminantium, 448-49, 451, 653
Methanocaldococcus, 448-50, 458-59
Methanocaldococcus jannaschii, 444, 450, 452, 499-500
Methanococcoides, 449
Methanococcus, 336, 449, 598
Methanococcus jannaschii,178, 444, 450-52
Methanocorpusculum, 449
Methanoculleus, 449-50
Methanofollis, 449-50
Methanogenium, 449
Methanohalobium, 449
Methanohalophilus, 449
Methanolacinia, 449-50
Methanolobus, 449
Methanomicrobium, 449
Methanomicrobium mobile, 653
Methanoplanus, 448-49
Methanopyrus, 336, 442-43, 449, 453-54, 458, 642
Methanopyrus kandleri, 23, 454-55
Methanosaeta, 459-50, 574, 585
Methanosaeta thermophila, 451-52
Methanosalsum, 449-50
Methanosarcina, 336, 443, 448-49, 574, 585, 598
Methanosarcina barkeri, 448, 450, 577, 609
Methanosphaera, 449
Methanospirillum, 443, 449-50
Methanospirillum hungatii, 448-49
Methanothermobacter thermoautotrophicus, 499, 500
Methanothermobacter, 449-50
Methanothermococcus, 449-50
Methanothermus, 443, 449, 458
Methanothermus fervidus, 177, 451, 464
Methanotorris, 449-50
Methanotorris igneus, 449-52
Methylobacter, 354,356
Methylocella, 366
Methylococcus, 354, 366, 598
Methylocystis, 354, 366
Methylomicrobium, 366
Methylomonas, 354, 366, 598
Methylosinus, 366, 367, 591
Meticilina, 705, 807
Metilación, 664
  DNA, 243, 303
Metilamina, 366, 389-90, 449
Metilasas, 712
4-Metilénglutamina, 682
Metileno, azul de, 58
Metilguanosina, 198
Metilinosina, 198
Metilmalonil-CoA, 411
Metilmercaptano, 407, 449
Metilmercurio, 664-65
Metilo, rojo de, ensayo, 804
Metilotrofo, 352, 365-68, 540, 590-93
  sulfataras hidrotermales, 641
  sustratos, 366
Metionina, 211
  código genético, 195
  estructura, 49
  fermentación, 584
  síntesis, 133
Método de criofractura, 471
Método de dilución en tubo, 697
Método de extensión en placa, 146
Método de goteo, producción de vinagre, 975
Método de tinaja abierta, producción de vinagre,
Método del vertido en placa, 146
Métodos de diagnóstico,
  aglutinación tests, 812
  ELISA, 823-24
  inmunodiagnósticos, 810-11
  métodos de ácido nucleico, 830-31
  tests de anticuerpo fluorescente, 820-21
  virología, 824-26, 835-36
Métodos de tinción de células, 607
Metódos moleculares, 615
Metronidazol, 887, 896, 937
MIC, *véase* Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)
Micelio, 412-14, 478-80
Micobacterias,
  ácido alcohol resistente, 412
  características, 412-14
  crecimiento lento, 412-13
  crecimiento rápido, 412-413
  morfología de las colonias, 413-14
  pigmenación, 413-14
Miconazol, nitrato, 922
Micosis, 906, 921-23
  subcutánea, 922
  superficial, 922
  sistémica, 922-23
Micotoxina, 921
Micrasterias, 488
Microaerófilo, 138, 161-62
Microbiana, actividad en la naturaleza, 607
Microbiana, adaptación, 862
Microbiana, biotecnología, *véase* Biotecnología
Microbiana, diversidad, 27-36
Microbiana, ecología, 19, 607, 626
  métodos, 607
Microbiana, medida de la actividad,
  control de células muertas, 620
  isótopos radiactivos y microelectrodos, 620-21
  métodos de isótopos estables, 621-22
Microbiano, crecimiento, *véase* Crecimiento
Microbiano, plástico, 625, 670
Microbiología,
  acuática, 17
  agricultura, 17
  aguas residuales, 929-32
  aplicada, 1, 2, 17, 19
  básica, 1, 19
  clínica, 797
  definición, 1
  del agua potable, 17
  era de la, 16-19
  historia, 9, 19
  industrial, 17, 957-85
  médica, 17
  nacimiento, 16-19
  salud pública, *veáse* Epidemiología
  siglo veinte, 16-19
  suelo, 17
Microbispora,417
Microbulbifer hydrolyticus, 617
Microcisto, 427
Micrococcus, 398, 399, 721, 805, 944
Micrococcus luteus, 162, 614
Microcoleus, 418-19
Microcolonia, 628, 632
Microdeleción,268
Microelectrodo, 607, 627
  medida de actividad microbiana, 620-21
Microfilamentos, 475
Microfósil, 323
β-2 Microglobulina, 758, 781-82
Microinserción, 268
Microinyección, 990
Micromanipulador, 621
Micromonospora, 415
Micronúcleo, 480
Micronutriente, 103-4-5
Microorganismos, 1
  agentes de enfermedad, 6, 7
  agricultura, 6, 7, 8
  beneficiosos, 7, 8
  en la industria del petróleo, 8
  en la naturaleza, 626-27
  impacto en actividades humanas, 6, 7, 8
  industria alimentaria, 6, 8
  interacciones con organismos superiores, 720-46
  necesidades energéticas de la sociedad, 6, 8
  tierra primigenia, 323
Microscopía, tinción, 58-59
Microscopio,
  aumentos, 56, 57, 58
  campo claro, 57, 58, 59
  campo oscuro, 57, 59
  confocal de barrido cob láser (CSLM), 61-62
  de campo claro, 57-59

    de contraste de fase, 57, 59, 615
    de contraste de interferencia diferencial (DIC), 61
    de fuerza atómica (AFM), 61
      de Hooke, 9
      de Leeuwenhoek, 9, 10
    electrónico de barrido (MEB), 63, 631-32, 695
    electrónico de transmisión (MET), 62
    fluorescente, 57, 60
    fuerza atómica (AFM), 61
    historia, 9
    imágenes en tres dimensiones, 60-62
    limitaciones, 614-15
    luz, 56, 60
    microscopía confocal de barrido láser (CSLM), 61-62, 629
    resolución, 56, 57, 58
Microsporidios, 336, 478, 862
Microsporum, 922
Microtítulo, placa, 807, 824-25
Microtúbulo, 475
Mielomas 813
«Milky», enfermedad de escarabeidos, 404
Milstein, César, 18
MinE, 139
Mineral, suelo, 630
Minerales carbonatos, 444
Minería del carbón, 660
Miniaturizado, ensayo, 806
Mínima Concentración Inhibitoria (MCI *véase* CM I), 688, 696-97, 712, 807
Mínima, temperatura, 151-52
Mini-Mu, 300-01
Mitad de una reacción, 114
Mitchell, Peter, 127
Mitocondrias, 23, 469, 503
    código genético, 196
    DNA, 177, 179, 473-74
    efecto de antibióticos, 474
    estructura, 470-72
    evolución, 329, 336, 474
    genética, 505-7
    mapa genético, 506
    ribosomas, 474
Mitomicina, 272, 700
Mitosis, 25, 469, 475-76
Mixobacteria deslizante, 391-92
Mixoma virus, 848-49
Mixosporas, 392-95
Mixotrofo, 361, 540
MMR, vacuna, 880-81
moa operon, 254
Modelo de ácido-tolerancia, 453
Moderado, halófilo, 159
Modulón, 222
Moenomicina, 700
Moho, 469, 481-83, 921
Molde, replicación, 180-81
Molécula, 39
Molécula apolar, 39, 42
Molecular, Biología, 19
Molecular, taxonomía, 342-45
Moléculas de clorofila como captadoras de luz o antenas, 543
Molibdeno, 105, 364, 374, 598-99, 600, 602, 664
Moluscos, protuberancia cristalina, 623
Monensina, 700
Monobactama, 701
Monocitos, 749, 752
    CD4, 897
Monoclonal, anticuerpo, 797, 812-16, 1004
    diagnóstico clínico, 814-16
    inmunodiagnóstico, 812-16
    producción, 813-14
    uso terapéutico, 814-16
Monod, Jacques, 18, 121, 281
Monómero, 42
    labilidad térmica, 464-65
Monooxigenasa, 540, 589, 591
Monosacárido, 44
Monosódico, glutamato, 970
Monóxido de carbono, 128, 364, 366, 449-50
Monóxido de carbono deshidrogenasa, 105, 364, 572, 575, 578, 600
Montagnier, Luc, 18
Montañas marinas, 642
Monurina, 669
Moraxella, 354, 374-75, 805
Morchella, 482-83
Mordedura, 906-8
Morfología, 22
    diversidad y 615
Mortalidad, 839, 841
    América y África, 867
    SIDA, 850
Mosquito, 858-59, 915
Mosquito, control, 854, 917
Mosto (vino), 978
Mot, proteínas, 83-84, 249
Motilidad,
    algas, 490
    espiroquetas, 431-32
    procariotas, 82-90
    protozoos, 479
Motivo, 780, 783
Motivo hélice-vuelta-hélice, 213
Movilidad por deslizamiento, 82, 85-87, 392, 420-21
    mecanismos, 86-87
Movimento microbiano, 82-89
    flagelos, 82-84
    fototaxis, 89-90
    movilidad por deslizamiento, 85-87
    quimiotaxis, 87-89
Movimiento, 3, 4
M-proteína, 871
MreB, proteina, 140
mRNA tardío, herpesvirus, 531
mRNA, *véase* RNA mensajero
MS2, bacteriófago, 247
MS2, virus, 488
MTH, proteína, 514
Mu bacteriófago, 246-47, 299, 520-22
    como mutágeno, 300
    crecimiento lítico, 521
    estructura, 520-21
    integración, 521
    mapa genético, 520-21
    mini-Mu, 300-01
    Mud-tac, 300-01
    rango de hospedador, 521
    replicación, 521
    represor, 521
Mucor, 482-83, 944
Mucosa, membrana, 720-21, 730
Mucosidad, 91-92, 392, 595, 601, 931
    superficie de la célula, 526
Mucus, 720-21
    superficie celular, 526
Muermo, 371
Muerte negra, *véase* Peste
Mullis, Kary, 18
Multicelular, organismo, 2
Múltiple, resistencia a drogas, 289, 712, 715, 853, 859
Múltiple, sitio de clonación, 309
Mupirocina, 701
Murámico, ácido, 338
Mureína, *véase* Péptidoglicano
Murina, toxina, 863, 919
Murino, tifus, 910
Mutación, 265-71
    adaptativa, 274
    base molecular, 267-71
    configuración cis, 296
    configuración trans, 296-97
    complementación, 296-97
    de errores de reparación de DNA, 273-74
    Deinococcus radiodurans, 436
    dominante, 296
    endospora latente, 97
    errores de replicación, 184-85
    espontánea, 267-68
    genomas RNA, 271
    implicando muchos pares de haces, 270-71
    «knockout», 315, 505
    no seleccionable, 266
    puntos calientes (hot spots), 271
    seleccionable, 266
    sin sentido, 270
    velocidad, 271
      cambios en la, 274
Mutaciones en sentido erróneo, 269
Mutaciones por desfase, 270, 272
Mutador, 274
Mutagénesis, 271-76
    biológica, 275
    carcinogénesis, 275-76
    casete, 314-15
    directa, 265, 275, 306, 314-15, 508, 995, 1004
    dirigida, 265, 275, 306, 314-15, 508, 995, 997
    esterilización, 693
    recA gen, 274, 276, 295
    transposén, 275, 300-01
Mutágeno, 265, 271-73
    biológico, 300
    químico, 271-72
    radiación, 272-73
    test de Ames, 275-76
Mutante sensible a la temperatura, 269-70
Mutantes, 265, 266-67-68
    aislamiento, 266-67
    no pigmentados, 266, 269
    tipos, 269
Mutualismo, 36
Mycobacterium, 411-15, 608, 874-76
Mycobacterium avium, 413, 832
Mycobacterium bovis, 413, 877
Mycobacterium chelonae, 413-14
Mycobacterium flavum, 598
Mycobacterium gordonae, 365, 413-14
Mycobacterium kansasii, 413-14
Mycobacterium leprae, 212, 761, 812, 827, 856, 875, 877
Mycobacterium marinum, 413-14
Mycobacterium paraffinicum, 413-14
Mycobacterium parafortuitum, 413-14
Mycobacterium phlei, 413-14
Mycobacterium smegmatis, 413, 965
Mycobacterium tuberculosis, 13, 14, 32, 298, 413-14, 498, 699, 703, 721, 753, 761, 775, 805, 810-12, 827, 831-32, 842-44, 860, 868-69, 874-77, 918
    genoma, 499-502
    resistencia antimicrobiana, 714
Mycoplasma genitalium, 411, 890
    genoma, 499, 500, 502
Mycoplasma hominis, 832
Mycoplasma mycoides, 410
Mycoplasma pneumoniae, 178, 499, 832
Myrica, 598
Myxococcus, 354, 392
Myxococcus stipitatus, 392-93
Myxococcus xanthus, 86, 392-95, 499, 500
Myxosarcina, 418-19

N gen, 252
N región, diversidad, 698
N-Acetilgalactosamina, 78, 79
N-Acetilglucosamina, 43, 44, 74, 76, 77, 141, 681
N-Acetilglucosamina fosfato, 80
N-Acetiltalosaminurónico (ácido), 78, 79
N-Acetiltransferasa, 707
NAD+,116-18, 129
    en el ciclo del ácido cítrico, 129
    en la plicolisis, 120-22
    en reacciones óxido-reducción, 117
    estructura, 116
    oxidación del ácido graso, 597
NADH deshidrogenasa, 123-24
NADP-, 116-18
    en fotosíntesis, 541, 552-54, 556
    estructura, 116
NADPH, el ciclo de Calvin, 555, 557
Naegleria fowleri, 940
Naftoquinona, 700
Nalidíxico, ácido, 176, 700, 701, 704
Nannocystis, 392
Nanobacterias, 65
Narciclasina, 339
Nasofaríngeo, carcinoma, 257
Natrialba, 446
Natrinena, 446
Natronobacterium, 34, 446
Natronoburum, 446
Natronococcus, 446
Natronomonas, 446
Natural, células killer, 748, 760-61
Natural, gas, *véase* Metano
Natural, inmunidad pasiva, 770
Natural, penicilina, 705, 967-68
Necrotizante, fascitis, 871
Negativa, cadena de RNA de virus, 244, 246, 525-26
Negativa, selección, 267
    células T, 780, 790-91
Negativa, tinción, 63
Negativo, control, 207, 215-17, 229
Negativo, elemento de control, 736
Negativo, superenrollamiento, 175
Negri, cuerpos, 908
Neihardt, Frederick C., 508
Neisseria, 283, 354, 374-75, 706, 712, 721, 730, 731, 743, 799-802, 805, , 819, 832, 834, 844-46, 878-80, 890-94
    resistencia antimicrobiana, 712-14
Neisseria meningitidis, 812, 832, 843, 860, 869, 875
Neomicina, 339, 706, 712, 807
Neoplasma, 256
Nervio, factor de crecimiento, 1001
Neumonía, 399, 424, 629, 832, 838, 862, 875, 885
    Legionella, 938
    Pneumocystis carinii, 898, 899
    neumocócica, 505, 812, 832, 862, 896-97
Neuraminidasa, 236, 527, 872, 883
Neurospora, 482-83
Neurosporeno, 547
Neurotoxina, 421, 488, 733, 737-38, 863
Neutralización, 797
    reacción, 812, 816-18
Neutrófilo, 158
Neutrófilos, *véase* Leucocitos polimorfonuclearos
Nevirapina, 709, 900, 901
Nevskia, 388
Newcastle, enfermedad, 1002
N-formilmetionina, 196
N-glycoside, 700
Niacina, *véase* ácido nicotínico
Nicho, 627
Nicho principal, 627
Nick, 176
Nicolaier, A., 875
Nicotínico, ácido, 106
nif genes, 420, 681

nif regulón, 602-3
*nif*HDK genes 602
Niklen, Steven, 18
Níquel, 105, 364, 575-76, 664
Níquel resistencia, 666
Nirenberg, Marshall, 18
Nisina A. 290
Nistatina,
  producción, 416-17
  producción comercial, 956
  síntesis, 953
Nitrapirina, 656
Nitrato, 104
  aceptor de electrones, 398, 562, 569
  nitrógeno, ciclo, 654-55
Nitrato, reducción, 569-70
  asimilados, 568, 655
  desasimiladora, 569-70, 655
Nitrato, reductasa, 105, 569-70
Nitrato, respiración, 568
Nitrato, test de reducción, 805
Nítrico, óxido, 753
Nítrico, óxido-reductasa, 569-70
Nitrificación, 17, 540, 561, 565-66, 625
  bioenergética y enzimología, 565-64
  ciclo del nitrógeno, 654-56
Nitrificantes, *bacterias*, 352, 359-60, 367, 559, 561, 565-66, 608, 628
  características, 359
  ecología, 360
  energética, 565-66
  metabolismo del carbono, 566
Nitrito,
  aceptor de electrones, 567, 569
  donador de electrones, 559, 565, 567
  en alimentos, 945-46
  oxidación a nitrato, 360
  reductasa, 569
Nitrobacter, 354, 565, 608, 655
Nitrobacter winogradskyi, 359
Nitrococcus, 359
Nitrofurano, 701
Nitrofurantoína, 807
Nitrogenasa, 105, 364, 373, 420, 540, 598-99, 602, 617, 682
  alternativa, 374, 599, 602
  ensayo,601-2
  inhibición por oxígeno, 373, 420, 678
  Strptomyces thermoautotrophicus 600, 602
Nitrógeno,
  aceptor de electrones, 568
  asimilación, 226
  atmósfera, 654-55
  ciclo, 654-56
  dióxido, 567
  en células, 103
  en la naturaleza, 104
  fijación, 8, 104, 226, 373, 540, 598-99, 608, 625, 672
  fuente de, 104, 133, 598
  mostaza, 272
  nitrógeno, ciclo, 655
  óxido, aceptor de electrones, 569
  producción en la desnitrificación, 569
  producto de almacenamiento, 422
  tierra primitiva, 323
Nitrosificantes, 565
Nitroso, ácido, 272
Nitroso, óxido, 569
Nitrosobacter, 359, 360
Nitrosococcus, 354, 359
Nitrosococcus oceanus, 359
Nitrosoguanidina, 272
Nitrosolobus, 359
Nitrosomonas, 354, 359, 360, 565, 608, 655
Nitrosospira, 359
Nitrosovibrio, 359
Nitrospina, 359
Nitrospira, 353, 359, 439
Nitzchia, 488-90
Nocardia, 414-15, 608
Nocardia otitidis-caviarum, 302
Nocardicina, 961
nod genes, 680-81
Nod, caja, 680-81
Nod, factores, 687-88-89
Nod, proteínas, 680-81
Nodularia, 418-19
Nódulo, tallos, 682-83
Nojirimicina, 700
Nomenclatura, taxonómica, 348-49
Nopalina, 676
Norfloxacina, 704, 712
Norwalk, agente de, 861, 939, 948, 955
Nosocomial, infección, 371, 799, 832, 839, 849, 852-53, 859
  estafilocócica, 886
Nostoc, 418-19
NotI, 302
NotI, restricción, 492
Novobiocina, 176, 700, 961
*nrr*A gen, 274
N-SERVE, 654
Ntr sistema, 226, 227
Nucleación, filtro de, 694-95
Nuclear,
  genona, 507-8
  membrana, 470
  planta, 699
  poro, 470-71
Nucleasa, 735, 752
Nucleico, ácido, 3, 22, 39, 42, 43
  banda negativa, 232, 244-45, 513
  banda positiva, 232, 244-45, 513
  enlaces de hidrógeno, 40
  estructura, 46-48
  síntesis, 133
Nucleico, sonda, 265, 304, 607, 797, 830-32, 834, 987
  detección de clones recombinantes, 992
  detección de patógenos en alimentos, 947
  diagnóstico, 830-32, 834
  ensayo de membrana, 831
  específico de especie, 334
  marcada con fluorescencia, 615-16
  muescas naturales, 615-17
  patógenos que pueden ser identificados, 832
  sintético, DNA, 306
  virus, 836
Nucleo,
  endospora,96
  enzima, RNA polimerasa, 187
Núcleo (celular), 3, 22, 23
  estructura, 4769-71
  origen 328
  herpesvirus, 531
  polisacárida, 79-80, 740
Nucleocápsida, 234-35, 260, 532-33
Nucleocápsida, proteína de rhabdovirus, 525-26
Nucleoide, 3, 22, 25
Nucleolo, 470
Nucleopore, filtro, 694-95
Nucleósido, 39, 46
  análogo, 900
  antibiótico, 700
Nucleosoma, 175-76, 178, 213
Nucleótido, 39, 42
  estructura, 46, 47
  función, 47
  síntesis, 133-34
Numérica, apertura, 57
Número de células, medida, 148-49, 613
Número variable de repeticiones tandem (VNTR), 1009
Nutrición, 103-7
  animales cercanos a sulfataras hidrotermales, 641-43
Nutricional,
  mutante, 266-67, 268
  requerimiento, capacidad biosintética, 107-8
Nutriente, 103-6
  gelatina, 12, 15
  limitante quimiostato, 149
  niveles en la naturaleza, 627-28
  reciclaje de, 8
  suelo, 632
Nyctotherus ovalis, 478

Objetivo, lentes, 57
Océanos, 638
  metanogénesis, 649-50
Oceanospirillum, 354, 383-84
Oceanospirillum linum, 617
Ochramonas danica, 473
Octopina, 676
Ocular, lentes, 57
Ogston, A., 875
Oligonucleótido, primer, PCR técnica de, 312
Oligosacárido, 44
OmpC proteína, 226
OmpF proteína, 226
OmpH proteína, 639
OmpR proteína, 226
Oncogen, 232, 257, 260, 286, 676
Ondas de mar, crecimiento, 378
Oomicetos, 482-83
Oospora, 482-3
Opa proteína, 636-38
Operador, 192, 220, 993-94
Operador, región, 216-217
Operon, 168, 192, 207, 216, 316-18, 340
Operón *gal*, 254
Opina, 676
Oporto, 978
Oportunista, infección, 727, 729, 896, 898, 923
Opsonización, 755, 769
Óptica, unidades de densidad, 148
Óptima, temperatura, 151
Oral, cavidad, 869
  biota normal, 721, 723-25
Orales, contraceptivos, 892
Orden (taxonomía), 346-47
ORF funcional, 497-98
ORF *véase* Marco de lectura abierta
Orgánica, materia,
  hábitat acuático, 634
  marina, 657-58
Orgánico ácido,
  descarboxilación, 585-86
  metabolismo, 595-96
Orgánico, aceptor de electrones, 581
Orgánico, compuesto, 40
  tierra primitiva, 324
  sulfurado, 657-58
Orgánico, suelo, 630
Organismo
  alcalófilo, 34
  facultativo, 138
  modificado genéticamente (GMO), 668, 987, 1005
Organismos primitivos frente a organismos modernos, 336-37
Organización Mundial de la Salud, 855-56
Órgano luminoso, 380
Órgano-mercurial, 699
Órganos, transplantes de, 743
Orgánulo, 22, 23, 322, 470-72
  fotosintético, 472-73
  genomas, 505-508
  respiratorio, 470-72
Orientia tsutsugamuchi, 912
Origen de la replicación, 181, 182 530
Orina,
  abuso de drogas, 814, 817
  cultivo, 799-800
oriS gen, 496
OriT sitio, 293-94
Orleáns, método, 975
Ornitina, 420, 435
Orologo, gen, 503
Orótico, ácido, 134
Orthohepadnavirus, 887
Orthomyxovirus, 256, 526-28, 882
Ortólogos, 494, 502
Ortosomicina, 700
Orujo, 979
Oryza sativa, 505
Oscillatoria, 418-19, 421
  limnetica, 554-55
  princeps, 86, 418-19
Oscillochloris, 437
Osmoaxis, 90
Ósmosis, actividad del agua, 159
Osmótilo, 160
Osteomielitis, 399, 885
Ostreococcus, 636-37
Otitis media, 424, 870
Ovulación, diagnóstico, 815
Oxacilina, 705
Oxalacetato, 129, 133, 411, 592, 595, 596
Oxalato, 586, 594
Oxalobacter, 354, 609
Oxalobacter formigenes, 586-87
Oxazolidinona, 700
Óxico, medio, 625
Oxidación, 28
Oxidación del hierro ferroso, 564-566
Oxidación ferrosa del hierro, 564-65
Oxidación-fermentación, 805
Oxidación-reducción pares, 114-16
Oxidación-reducción, reacción de, 113-16, 117
  balance interno, 120
  estados, 117
Oxidasa, ensayo, 376, 380, 801, 805
Oxidasa terminal, 127
Oxidativa, fosforilación, 103, 119-20, 128, 505, 507, 588
Oxigenasa, 105, 589, 591, 669
Oxigénica, fotosíntesis, 327, 488, 540-42, 552-53, 645
Oxígeno,
  aceptor de electrones, 589
  acumulación en la atmósfera, 327-28, 338
  condiciones de cultivo, 162-63
  crecimiento y, 161-65
  fagocitos, 753
  formas tóxicas, 163-64, 546, 753
  inhibición de nitrogenasa, 420, 602, 678
  isótopo estable, 622
  lagos, 634
  macronutrientes, 104
  microambientes, 627
  microelectrodo, 620
  partículas de suelo, 627
  producción en la fotosíntesis, 541-42
  reactivos en procesos metabólicos, 589
  ríos, 634-35
  singlete, 164, 546, 753
  sistema transportador de electrones, 126
  triplete, 163-64
Oxitetraciclina, 707
Oxotransferasa, 105
Ozono, 698
  escudo, 327, 338

P gen, 252
P22 bacteriófago, 283
P680 clorofila, 553
P700 clorofila, 553
P870, 549-50
Pace, Norman, 34
Paenibacillus, 403
Paimitato, 45, 133-34
Palindrómico, 302
Palmítico, ácido, 80, 681
Palmitoleico, ácido, 45
Pan, 487
Pandémico, 839-40
  gripe, 883-84
Pantano, 630, 658
Pantoténico, ácido, 106, 577
Papel, industria, 699
Paperas, 775, 856, 880
  vacuna, 771, 854, 880
  virus, 825, 836
Papillomaviridae, 529
Papilomavirus, 257, 530
Papovavirus, 256
PAPS, *véase* fosfato de fosfoadenosina
Paracoccus, 354,364, 655
  denitrificans, 126-27, 365, 570, 608
Paracristalina, capa superficial, vétase capa
Paralogos, 494, 502
Paramecium, 35, 64, 196, 479-82
Paramilón, 488, 593
Paramyxovirus, 256, 527, 879-80
Parásito, 720
  coevolución de hospedador y parásito, 848-49
Parásito intracelular estricto, 31-32, 381-83
Parasporal, cuerpo, 405
Paratífica, fiebre, 733, 843, 875
Paratión, 668
Paratosa, 80
Pardee, Arthur, 18
Pared celular, 23
  algas, 488, 490
  Archaea, 79, 338
  Bacteria, 338
  bacterias Gram negativas, 74, 76, 81
  bacterias Gram positivas, 74, 77, 81
  barófilos, 639
  crecimiento intercalar, 389
  crecimiento polar, 389
  Eukarya, 338
  Halobacterium, 447
  hongos, 482-83
  procariótica, 74, 79
  síntesis, 141-42, 701, 706
Partícula que reconoce la señal (SRP), 203-204
Partículas, cañón de, 1007
Parvovirus, 256, 529
  H-1, 234
Pasiva, aglutinación reacción de, 819
Pasiva, inmunidad, 770-71
  artificial, 770
  natural, 770
Pasteur, frascos, 11
Pasteur, Louis, 8, 11, 12, 18, 49, 50, 691
Pasteurella, 518
Pasteurización, 688, 691, 692-93
  leche, 691, 692, 842, 854, 877
  origen, 691
  vino, 691
Pastillas de levadura prensada, 977
Patata,
  tizón de la, 482-83
  virus del enanismo amarillo, 525
Patogeneidad, 720
Patogénesis, 729
Patógeno, 1, 720
  adherencia, 730-31, 734
  aislamiento de especímenes clínicos, 797-03
  atenuado, 732
  capacidad de invasión, 732-33
  colonización, 731-32
  crecimiento, 729, 731-32
  entrada en el hospedador, 729-31
  erradicación, 875-76
  especificidad de tejido, 730, 743
  especificidad del hospedador, 730-31
  identificación, *véase* métodos de diagnóstico
  invasión, 729, 731
  localización en el cuerpo, 731-32
  toxigenicidad, 732
  virulencia, 732-34
Patógenos de plantas, 371
Patoginidad, islas, 318
PBP, *véase* Proteínas que unen penicilina
pBR322 fago, 494
PCR, *véase* Reacción en Cadena de la Polimerasa
Peces, órganos de luz, 380
Pectina, 372, 490, 593, 653
Pectinasa, 593, 972
Pectinolíticas, bacterias, 434
Pediococcus, 400
Pedomicrobium, 388
Pedúnculo, 388, 391
Pelobacter, 354
  acetylenicus, 586
  acidigallici, 585-86
  massiliensis, 586
Pelochromatium roseum, 430
Pelodictyon, 429-30
Pelodictyon clathratiforme, 429-30
Pelos F, 291
Pélvica, inflamación, 890-91, 893
Penetración, virus, 240-41-42
Penicilina, 79, 140, 700-1-2, 705-6, 711-12, 872, 913
  biosintética, 958, 967-68
  estructura, 705
  G, 705-6, 711, 807, 968
  inhibición de la transpeptidación, 141-42
  método de selección, 267
  modo de acción, 706
  natural, 705, 967-68
  producción comercial, 960, 964, 967-68
  resistencia, 711-13
  semisintética, 688, 705, 958, 967-68
  tipos, 705-6
Penicilinasa, 892
Penicillium, 159, 482-83, 700, 702, 713, 944, 967
Pentapéptido, 141
Pentosa, 43, 44, 132, 584
PEP, *véase* Fosfoenolpiruvato
Peprostreptococcus, 399, 721, 726
Péptica, úlcera, 387, 860
Peptídico, antibiótico, 50, 700
Peptídico, enlace, 39, 40, 48, 49, 200
Peptídico, enlaces cruzados, pared celular, 74
Peptidil transferasa, 202
Péptido Ii, 759-60
Péptido sintético, vacuna, 772
Péptido, sitio, 200, 201
Peptidoglicano, 43, 50, 56, 74-77, 132, 338, 425-26
  diversidad, 76, 77
  estructura, 74-76
  síntesis, 140-42
Peptococcus, 399, 721, 726
Peracético, ácido, 698
Perforina, 759-60, 810
Peridental, enfermedad, 725
Peridental, membrana, 66, 723
Periodo agudo, 841
Periodo convaleciente, 842
Periplasma, 56, 72, 81, 385
  Ignicoccus, 462-63
Peritrica, flagelación, 56, 82, 83, 84, 85, 372, 375, 380
Permanente, línea celular, 238
Permeabilidad, 69
Permisivas, células, 242
  hospedador, S V40, 530
Permutación circular, DNA, 248
Perniciosa, anemia, 775, 970
Peroxidasa, 105, 164, 824
Peroxisoma, 475
Perrin, David, 18
Persistente, infección vírica en animales, 256
Persona a persona, enfermedad microbiana, 867- 894
  transmisión por contacto directo, 885-89
  transmisión por el aire, 868-84
  transmisión sexual, 889, 903
Persona a persona, transmisión, 867-904
Pertusis, 733, 841, 843, 856, 863, 873-75
  toxina, 733
  vacuna, 771, 854, 874
Peso seco, 149
Peste, 844, 855, 856, 858, 875, 906, 918-20
  bubónica, 919
  incidencia en los Estados Unidos, 920
  neumónica, 919
  septicémica, 919
  selvática, 919
  vacuna, 771, 858
Pesticida, 664
  biodegradación,668-71
Petri, placa, 15, 109
Petri, Richard, 15
Petroff-Hausser, cámara de recuento, 145
Petróleo, 123, 622, 647, 699
  biodegradación,666
  industria, 699
  producción microbiana, 667
Pfu polimerasa, 313
pH, 138, 159
  alimentos, 945
  efecto sobre el crecimiento, 158-59
  gradiente, 126
  intracelular, 158-59
Phaeophyta, 488
Photobacterium, 354, 380-81
  phosphoreum, 380
Photoblepharon palpebratus, 380
Photorhizobium, 683
Phylum, 322
Physarum, 490, 491
Phytophora, 944
PI, 688
Picornavirus, 256, 524
Picrophilus, 34, 448, 450
  oshimae, 158
Piel,
  anatomía, 722
  barrera frente a patógenos, 742-43
  residente, 722
  transitoria, 722
Pielonefritis, 743
Pigmentación, micobacterias, 413-14
Pigmento accesorio, 548
Pili, 91, 513-14, 730
  conjugación, 291-96
  sexual, 291
Pilórica, úlcera, 399
Piloto, planta, 963
Pimelyl-CoA, 591
Pinta, 433
Pinus, 673-74
  contorta, 674
  rigida, 674
  thunbergii, 505-6
Pinzas,
  de láser, 607-612
  ópticas, 607, 612
Piogénica, infección, 744
Piogénico, organismo, 754
Pirella, 425-26
Piridoxina, 727
Pirimidina, 46, 106, 584
  dímero, 273
  síntesis, 133-34, 222
Pirita, 625, 659, 663
  ciclo de propagación, 659-60
  iniciador de la reacción, 659-60
  oxidación, 659-60
Pirocianina, 961
Pirogénica, infección, 744
Pirógeno, endógeno, 740, 744
Pirolobus, fumarii, 152, 460-62
Pirotita, 661
Pirrólico, anillo, 124
Piruvato, 121-22, 133, 397, 411-12, 449, 584
  carboxilasa, 596
  ciclo del ácido cítrico, 129-30
  descarboxilasa, 121
  donador de electrones, 582
  metabolismo, 59, 595-96
  oxidación, 472
  quinasa, 121, 584
  reducción, 121-22
Pityrosporum, 721
Pityrosporum, ovalis, 722
Pl bacteriófago, 254, 283, 316
Placa, 238
  Bdellovibrio, 386
  dental, véase Placa dental
  ensavo de virus, 238-39
  neumónica, 919
  recuento, 146-47
    dilución de las suspensiones, 147
    estimaciones erróneas, 147
  sembrada, 110, 611
  unidad formadora de, 240
  vital, 232
Planctomyces, 30, 31, 425-26, 567
  maris, 425-6
  Pirella, grupo, 338, 353
Plano de la división celular, 139-41
Planococcus, 398
Planta-microorganismo, interacción, 671-75
Plantas, biotecnología de, 1006-8
  producción de vacunas, 1007
Plantas, virus de, 233, 522-23, 1007
Plasma, 748-50
Plasmáticas, células, 750, 767
Plásmido con DNA monocatenario, 287
Plásmido críptico, 288
Plásmido F, 280, 287, 291-96, 316, 496
  mapa genético, 287
  integración, 293
Plásmido F', 295
Plásmidos, 22, 25, 177, 179, 265, 281, 286-91, 340, 496
  aislamiento, 286
  conjugativos, 278, 288, 291-96, 513
  crípticos, 288
  curación, 287
  DNA, 287
  DNA, vacunas, 772-73
  e ingeniería genética, 290-91
  factores de virulencia, 863
  grupos de incompatibilidad, 287

  halófilos extremos, 446
  integración en el cromosoma, 287
  naturaleza física, 286
  número de copias, 286-87, 308
  pBR322, 308-9
  R100, 289-90
  replicación, 185-86, 286-87, 308
  resistencia a metales, 665
  resistencia, véase plásmidos
  significado biológico, 288-89
  tipos, 288-89
  vector de clonación, 308-9
  virulencia, 289-90
Plasmodios, 485-86
Plasmodium, 479-81, 743, 832, 844, 849, 863
Plasmodium falciparum,505, 915-18
Plasmodium vivax, 479, 915-17, 1007
Plásticos, 699
  biodegradación,670-71
  fotobiodegradables, 670-71
  microbianos (bioplásticos), 625, 670
Plastocianina, 105, 553
Pleurocapsa, 421
Plomo, 664
  compuestos 715
PMN, véase Leucocitos polimorfonucleares
Pneumocystis carinii, 505, 812, 832, 862, 896-97
Población, 4, 626
  ciclo de crecimiento, 144-45
  crecimiento de, 142-45
Podredumbre blanda, 371
Podredumbre de la cebolla, 371
pol gen, 535, 537
  retrovirus, 258-59-60
Polar, crecimiento, 388
Polar, flagelación, 82, 84, 85, 372, 380, 383
Polar, molécula, 39
Polaribacter, 427-28
Poli-β-hidroxialcanoato, 92, 119, 340, 555, 671
Poli-β-hidroxibutirato (PHB), 56, 92, 93, 94, 119, 374, 548, 628, 671
Poli-β-hidroxivalerato, 671
Poli-A, cola en el mRNA, 193, 255, 340
Poliacrilamida, gel electroforesis, 508
Poliadenilación, 193
Policistrónico, mRNA, 170, 191-92, 201, 222, 229, 255, 316, 522
Policlonal, antisuero, 812-13
Policlonales, anticuerpos, 797
Polieno, 700, 710
Poliestireno, 670
Poliéter, antibiótico, 700
Polietileno, 670
Polifosfato, 92, 384, 628
Poligalacturonasa, 593
Polimerasa, reacción en cadena, (PCR), 157, 265, 307, 312-14, 435, 497
  alta temperatura, 313
  amplificación de genes, 332
  análisis de comunidades microbianas, 618-19
  aplicaciones, 313
  diagnosis clínica, 831-32
  huella de DNA, 313, 1009
  iniciador oligonueleotídico, 312
  virus, 836
Polimerización, reacción, 138
Polímero, 39, 42
Polímero aniónico de aluminio, 933
Polímero de cloro, 932-33
Polímero sintético, biodegradación, 670-71
Polímeros,purificación del agua, 932-33
Polimixina, 404, 701, 704, 961, 964
Polimixina B, 795
Polimórfico, virus, 527
Polimorfismo, 758, 780, 783-84
Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción, 1009
Polimorfonucleares leucocitos, 748, 753
Polinucleótido, 39, 46, 47
Polio, 525, 772, 849, 856
Polio, vacuna, 771, 849, 854, 855
Poliovirus, 234, 246, 524, 939
  estructura, 524
  replicación, 524-25
Polioxina, 700, 710
Polipéptido, 39, 51, 169
Polipropileno, 670
Poliproteína, 212, 533
Polisacárido, 3, 39, 42, 43, 132, 628-30
  estructura, 43-45
  metabolismo, 593-95
  O, 79, 80, 740
  síntesis, 132
Polisoma, 201
Poliuretano, 670
Polivalente, vacuna, 884, 1002
Polivinilo, cloruro, 670
Polvo, en el aire, 869
Polyangium, 393
Polysphonia, 488-90
Porcentaje de bases GC, 322, 341
Porfirina, 124
Porina, 80, 81, 639
  específica, 81
  no específica, 81
Porter, Rodney, 18
Positiva, banda de RNA en virus, 244-45-46, 522-25
Positiva, selección, células T, 780, 789-91
Positivo, balance de agua, 159
Positivo, control, 207, 217-18, 229, 602
Positivo, superenrollamiento, 176-77
Postraduccional, modificación, 197, 204, 525, 990
Potable agua, 932
Potasio, 70
  ioduro, 922
  requerimiento celular, 104
  soluto compatible, 160-61, 447
  transportador, 72
Poxvirus, 256, 529, 532-33, 709
  propiedades, 532-33
  replicación, 533
  vacunas recombinantes, 533
Precipitación, antígeno-anticuerpo, 797, 816-18
Precipitina, banda, 817
Predador,
  Bdellovibrio, 384-86
  ciliados, 480-81
Prefiltro, 694
Pre-mRNA, 171, 192
Preproinsulina, 211-12, 1001
Presión alta, efectos moleculares, 639
Prevalencia de una enfermedad, 839-40
Prevotella ruminicola, 653
Pribnow, caja de, 189
Primaquina, 916
Primaria, estructura,39
  DNA, 47
  proteína, 51, 169
  RNA, 47
Primaria, respuesta de anticuerpos, 748, 767, 810
Primaria, sífilis, 892-93
Primario, donador de electrones, 116
Primario, fermentador, 646-47
Primario, linaje celular, 835
Primario, productor, 625, 634, 636,
  autrofo, 28
Primario, transcrito, 168, 171, 192
Primario, tratamiento de aguas residuales, 930
Primarios, metabolitos, 958, 960-61
Primasa, 180-81
  ϕX174, 115
Primeros seres eucarióticos, 328
  código molecular, 325-26
  metabolismo, 326-27
  origen del DNA como material genético. 326
  vida de RNA, 325-26
Prión, 232, 261-62
Priones bovinos, 862
Procariota, 1, 6, 22, 56
  biomasa, 6
  carencia de esteroles, 68
  cromosoma, 25, 177-79, 283, 316-18
  diversidad, 347-48
  DNA, 25
  elementos transponibles, 298
  estructura celular, 23
  expresión génica, 229
  extremófilos, 29
  fósiles, 323
  genética, 170-71
  intercambio génico, 265
  morfología, 63, 64
  movilidad, 82-90
  mRNA, 191-92
  multiplicación vírica,255
  pared celular, 74-79
  producción de antibióticos, 706-7
  proteínas determinantes de la forma celular, 140
  ribosomas, 200-01-02
  secreción de proteínas, 203
  tamaño celular, 64, 65
  traducción, 170
  transcripción, 170
  vector de clonación, 997
  vector de expresión, 994-95
Procesamiento de proteínas, 211-12
Proceso de fango activado, 931-932
Proceso de leudado, 977
Prochlorococcus, 424, 644
Prochloron, 422
Prochlorophyta, 352, 422-23, 636
Prochlorothrix, 424
Proctitis, 894
Prodigiosina, 379
Producto, 112
Producto, inhibición, 209
Profago,251, 286
  inducción, 251
Profundidades marinas, microbiología, 638
Proinsulina, 1001
Prolina:
  código genético, 195
  estructura, 49
  síntesis, 133, 209
  soluto compatible, 161
Promiscuo, comportamiento sexual, 902
Promotor, 168, 187-88-89-90, 218, 220, 993-94
  bacteriófago lambda, 251-53
  caja Pribnow, 189
  eucariótico, 190
  fuerte, 190, 986
  vector de expresión, 993-94
Promotores fuertes, 190
Prontosil, 702
Propagación, ciclo, 659, 660
2-Propanol, 585
Propazina, 668
Propileno, óxido, 945-46
Propionato quinasa, 584
Propionato, 727
  producto de fermentación, 584-85, 646-47
  producción en el rumen, 651-53
Propionibacterium, 411-12, 415, 585, 721, 970
Propionibacterium acnes, 722
Propiónico, ácido, bacterias del, 411-13, 415, 609, 945
Propiónico, ácido, fermentación del, 585
Propionigenium, 412, 575, 609
Propionigenium modestum, 586-87
Propionil fosfato, 584
Propionil-CoA, 411, 583-84
Prosteca, 352, 389, 391, 427
Prostecadas bacterias, véase Bacterias con pedúnculos
Prostético, grupo, 113
Prosthecobacter, 388, 427
Prosthecochloris, 429
Prosthecomicrobium, 387
Proteasa, 223, 735, 752, 958
  aplicaciones industriales, 972
  inhibidor, 709, 868, 901
  poliovirus, 524
  producción comercial, 972-73
  retrovirus, 258
Protectora, envoltura, 809
Proteína, 3, 22, 39, 42, 43
  A, 515, 828
  activada por (PAC=CAP), 218-20
  Archaea, 339-40
  autoprocesante, 510
  B7, 792
  Bacteria, 339-40
  catalítica, 50
  CD28, 792
  de la cubierta:
  MS2 fago, 514
  TMV, 522
  de la envoltura, 259, 526
  de Rieske, 127
  desnaturalización, 52, 53, 203
  dímero, 213
  dominios, 52
  estructura, 48, 50
  estructura cuaternaria, 52
  estructura primaria, 51, 169
  estructura secundaria, 51, 52
  estructura terciaria, 52
  estructural, 50
  Eukarya,339-40
  hipertermófilos, 463
  inhibidores de síntesis, 704-705
  modificaciones postraduccionales, 197, 204
  movilidad por deslizamiento, 86-87
  periplásmica, 66, 573
  perplásmica de unión, 72, 73
  plegamiento de, 203, 999
  plegamiento erróneo, 262
  puentes de hidrógeno, 40, 51
  que se autoprocesa, 503
  que se une a cadena sencilla, 182, 268-69, 677
  quimioatrayente de macrófagos 1 (MPC-1)794
  quinasa detectora, 207
  represora, 207, 216, 217
  secretora, 203-4
  síntesis, véase también Traducción
  transportadora:
    aquaporina, 70
    grupos acilo (ACP), 133
    membrana, 70-71
    necesidad, 70-71
  temprana, 246
    T4 baceriófago, 248
    virus, 246
  verde fluorescente, 996
Proteínas de membrana, 66

Proteínas de unión, 81
Proteínas de virus específicos, 235
Proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MCH), 681-684, 748, 758-760, 780
  clase I, 748, 758-760, 780, 82, 918
  clase II, 748, 758-760, 763, 777, 780, 782, 918
  funciones, 758-760
  genética, 758, 782-84
  estructura, 766, 782-83
Proteínas Fli, 83-84
Proteínas Fts, 138-39
Proteínas medianas, bacteriófago T4, 248
Proteínas perplásmicas de unión, transporte dependiente de, 72-73
Proteínas receptoras-trasnsductoras (MCP), 227, 228
Proteínas tardías, 232
  bacteriófago lambda, 252
  bacteriófago T4, 248
  virus, 246
Proteínas, receptoras, transductoras, 227, 228
Proteínas-antígeno interacción:
  estructura, 780-81
  evolución, 780-81
Proteobacteia, 29-30, 322, 336-37, 352, 354-99
  bacterias rojas del azufre, 355-57
  bacterias rojas no del azufre, 355-58
  géneros más importantes, 354
  grupo alfa, 354, 370, 373, 382, 384, 387-88
  grupo beta, 354, 370, 374, 384, 388
  grupo delta, 354, 384, 386, 392
  grupo épsilon, 354, 384, 386
  grupo gamma, 354, 370, 374-75, 382, 384-88
Proteoma, 494, 508-9
Proteoma mitocondrial de levaduras, 508
Proteómica, 494, 508-9
Proteus, 289, 377-78-79, 727, 743, 799, 801, 804, 944
Proteus mirabilis, 379, 729, 818
Proteus vulgaris, 379, 616
Protones, bomba de, 69, 579
Protones, fuerza motriz de, 72, 84, 86, 103, 131, 446, 458, 549-50, 552-53, 562, 564, 572, 574-75, 580, 586, 588, 591, 592
  conservación de la energía, 125-28
  energía para el anabolismo, 131
  formación de ATP, 128
  generación, 127
Protooncogenes, 257, 260
Protoplasto de la espora, 96
Protoplastos, 56, 78, 409
  esporas, 96
  formación, 78
Prototrofo, 267
Protorella, 721
Protozoos, 23, 35, 469, 479-82
  alimentación, 479
  enfermedades infecciosa, 856
  hábitat, 479
  movilidad, 479
  rumen, 652-53
Protuberancia cristalina de moluscos, 433
Providencia, 377, 805
Provirus, 232, 251, 260, 535, 898
Proyecto de base de datos (RDP), 322
Prueba de aglutinación con látex, 819
Pruisner, Stanley B., 18, 261
Pseudanabaena, 418-19
Pseudomembrana, 873
Pseudomonadal, 352, 368-71
  características, 368-69
  grupo acidovorans, 370
  grupo diminuta-vesicularis, 370
  grupo fluorescente, 370
  grupo pseudomallei-cepacia, 370
  grupo ralstonia, 370
  patogénico, 369-71
  versatilidad nutricional, 369
Pseudomonas, 29, 30, 159, 283, 288-89, 301, 354, 363-64, 368-71, 508, 570, 590, 608, 655, 799, 801, 803-5, 944, 970
Pseudomonas aeruginosa, 59, 62, 108, 224, 301, 369-70, 371, 629, 665, 712, 733, 737, 742, 798, 800, 808, 853
  genoma, 499-500
  resistencia antimicrobiana, 714
Pseudomonas carboxydovorans, 364-65
Pseudomonas diminuta, 370
Pseudomonas fluorescens, 370-71, 608, 614
Pseudomonas maltophilia, 370-71
Pseudomonas marginalis, 371
Pseudomonas putida, 370
Pseudomonas stutzeri, 370-71
Pseudomonas syringae, 370-71
Pseudomonas vesicularis, 370
Pseudopeptidoglucano,78, 79, 338
Pseudoplasmodio, 486
Pseudouridina, 198
PSI⁺ fenotipo, 261-62
Psicrófilo, 29, 138, 152, 153-55, 638, 973
  adaptaciones moleculares, 154-55
  extremo, 638
Psicrotolerante, organismo, 138, 153-54, 923-54
Psitacosis, 423-24, 775, 844, 856
P-sitio, ribosorna, 200-01
Psychroflexus, 155, 427-28
Pública, salud, 839, 854-65
Puente bisulfuro, 52
Puf genes, 550-51
Puh genes, 550-51
Pulga de la rata 919
Pulque, 371
Pululanasa, 973
Pulvomicina, 339
Puntos calientes para mutaciones, 271
Purificación de agua, 854, 928-29, 932-34
Purina, 46, 106
  fermentación, 584-85
  síntesis, 133-34
Puromicina, 202, 339,701, 704-5
Pus, 754, 885
Putrefacción, 11, 407
Putrescina, 407, 586
Pyrobaculum, 458-64
Pyrobaculum aerophilum, 462
Pyrococcus, 442-44, 453-55, 458-60
Pyrococcus abyssi, 178
Pyrococcus furiosus, 165, 313, 453-54
Pyrococcus horikoshii, 499, 500
Pyrococcus woesei, 973
Pyrodictium, 336-37, 458-59, 460-62
Pyrodictium abyssi, 461
Pyrodictium occultum, 461
Pyrolobus, 33, 458-60, 460-62

Q ciclo, 127
Q gen, 252
Q, fiebre, 381-82, 856, 912
Queso suizo, 411-12
Queso, 8
  vegetariano, 1004
Química combinatoria, 715-16
Química, señal, 3
Químicamente definido, medio de cultivo, 107
Químico, agente mutagénico, 271-72
Químico, control de crecimiento, 696-97
Químico, enlace, véase Enlace
Quimilitrofo estricto, 364
Quimiolitotrofia, 17, 557-59
  energética, 559
Quimiolitotrofo, 22, 28, 130-31, 352, 540, 561, 626, 633
  autotrófico, 561
  bacterias nitrificantes, 359-60
  bacterias oxidadoras de azufre, 360-63
  bacterias oxidadoras de hidrógeno, 656-57
  bacterias oxidadoras de hierro, 360-63
  estrictos, 364
  facultativo, 361, 364
Quimioorganotrofos, 22, 28, 103, 130, 131, 573
  medida en la naturaleza, 610, 620, 621
Quimioósmosis, 103, 126-27
Quimioquina, 780, 783-84
Quimiorreceptor, 81, 88
Quimiostato, 138, 148-51
  A-6 concentración de nutriente limitante, 149-50
  densidad celular, 150
  usos experimentales, 150-51
  velocidad de dilución,149-50-51
Quimiotaxis, 56, 87-89, 227-28
  técnica capilar ptua el estudio de, 88, 89
Quimioterapéutico, agente, 688, 699
Quinacrina, 927
Quinasa, 207, 225
  detectora, 225-27
Quinolona, 688, 704, 712
Quinona, 106, 123-24, 125, 549-50, 551, 552, 553, 560
Quitina, 338, 469, 481-82, 490, 593, 710
Quitinasa, 596
Quitosán, 481-82
Quorum sensing, 207, 224, 279, 381

R grupo, aminoácido, 48, 49
R-1, 3-Glucanasa, 593
Rabia, 12, 525, 741, 754, 844, 856, 861, 906-8, 1004
  inmunoglobulinas, 907
  vacuna, 767, 771, 854, 907-8, 1001, 1004
  virus, 525, 844
Racemasa, 50
Racémica, mezcla, 49
Raciones de la fase luminosa, fotosíntesis, 541
Rad, 692
Radiación:
  esterilización, 692-93
  longitudes de onda, 273
  mutagénesis, 272-73
  resistencia, 435-36
  sensibilidad, 693
Radioinmunoensayo (RIA), 797, 823, 827-28
  ensayos de orina para drogas, 814
Radioisótopos, métodos de determinación de actividad microbiana, 620-21
Raíces de cebada, 614
Raíz del pelo, 675-76
Raíz marrón, 483
Ralstonia, 354, 363, 364, 368
Ralstonia eutropha, 365, 560
Ralstonia sacharophila, 370
Ralstonia solanacearum, 370, 71
Ramantadina, 884
Reacción cruzada, entre antígenos, 757, 823
Reacción química:
  endotérmica, 111
  energía libre, 110-11
  exotérmica, 111
  formación, 111
Reactivo específico de terminación de la cadena, 305
RecA, proteína, 254, 274, 276-77, 282, 295
Recalcitrante, compuesto, 540
RecBCD, enzima, 276
Receptor célula T (TCR), 748, 755, 757-78, 760, 776, 780
  dominio constante, 757-58, 781, 788
  dominio variable, 757-58, 776, 781, 788
  estructura, 757-58, 787-88
  genética, 785, 788-89
  unión al antígeno, 787-88
Receptor, virus, 241
Recipiente, conjugación, 291
Reclinomonas americana, 506, 507
Recombinación, 265, 276-78
  aspectos moleculares, 276-77
  células somáticas, 785
  de sitio específico, 300-301
  detección, 278
  en la transducción, 284
  en la transformación, 281-82
  específica de sitio, 300-01
  general (homologa), 276-78
  in vitro, 307
  mapeo genético, 277
Recombinante, DNA, 307
Recombinante, vacunas, 1001-2
Recuento de células totales, 145-46
Redox, reacción, véase Reacción de oxidación-reducción
Reducción del azufre, células primitivas, 327
Reducción, potencial, 103, 114
Reductor, agente, 163
Refrigeración, 154
Refrigerantes internos, 961
Región tardía, SV40, 530
Región temprana:
  adenovirus, 534
  SV40, 530
Regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), 780
Regulación, 206-30
  actividad enzimática, 208-11
  generalidades, 207-8
  principales tipos, 207-8
Regulador, RNA, 224-25
Reguladora, proteína, 212-14
Regulón, 218, 225, 316, 602-3
Reinos, 481-482
Relaxina, 1001
Renina, 972, 1004
Reovirus, 234, 256, 528-29
RepE gen, 494
Repelente, 87, 88, 227-28
Repetición terminal, DNA, 248
Réplica en placa, 266, 268
Replicación, 3, 4, 5, 168-69-70, 180-86
  ácido nucleico vírico, 185-86, 240-46
  adenos-irus, 534
  bacteriófago lambda, 252
  bacteriófago Mu, 521
  bacteriófago T4, 247-50
  bacteriófago T7, 518-19
  banda líder, 182-84
  bidireccional, 181-82-83, 287, 519
  cadena retrasada, 182-84, 515
  cebador proteico, 186
  cebadores (iniciadores), 180-86
  círculo rodante, 252-53, 287, 291-92, 515-16
  desenrollamiento de DNA, 183

  dirección, 183
  DNA linear, 185-86
  errores, 184-85, 269, 271
  estructuras theta, 181
  factoría, 184
  fidelidad de copia, 184-85
  formación del anillo de FtsZ, 139
  horquilla, 181-85
  iniciación, 181
  intermediarios teta, 287, 516
  moldes, 180-81
  origen de, 181, 182
  plásmido, 185-86, 287, 308
  poliovirus, 524-25
  polivirus, 525
  poxvirus, 533
  retrovirus, 258-60
  semiconservativa, 168, 180
  unidireccional, 287
  virus, 232
Replisoma 184
Represión, 215-17, 222
  eucariotas, 229
Represor, 227, 993-94
  lambda, 252-53-54
  virus, 251
Reproducción, 3, 4
  características celulares, 3, 4
Resazurina, 163, 802-3
Reservorio, en las enfermedades infecciosas, 754, 839-40, 842-45
Resfriado común, 881-82
Residuos de anclaje, 783
Residuos del carbón, 451
Residuos sólidos, 670
Resistencia a un compuesto antimicrobiano, 688, 711
  mecanismo, 711
  propagación, 713-15
Resistencia del metal pesado, 665-66
Resistencia, plásmido, véase R plásmido
Resolución, microscopio, 56, 57, 58
Resorcinol, 586
Respiración anaeróbica, 130, 448, 540, 568-69, 573-75
  aceptores de electrones, 579
  control global, 223
  energética y flujo del carbono, 130
Respiración del sulfato, 568
Respiración, 103, 119-20, 122-23
  aeróbica, 122-23
  anaeróbica, 130, 448, 568-69, 573-74
  ciclo del carbono, 645-46
Respiratorio sincitial, virus, 709, 882
Respiratorio, tracto, 720, 869
  anatomía, 728
  biota normal, 721, 727-28
Respuesta al choque térmico, 223-24
Respuesta, regulador de, 207, 225-26, 227-28
Restón, virus, 862
Restricción, enzima, 242, 265, 302-5, 307
  análisis de DNA, 303-4
  mapeo físico, 304
  reconocimiento de secuencia, 302-3
Restricción, puntos de, 504
Restricción-modificación, sistema, 242-43, 302-5
Reticulado, cuerpo, 424-25
Retículo, 651
Retinal, 447-48
Retrón, 534
Retrotransposón, 258, 534
Retrovirus, 232-33, 236, 245, 255-56, 258-60, 513, 708, 896, 995
  estructura, 258-59
  genes, 535
  genomio, 258-60, 535
  integración, 535
  replicación, 258-60
  terapia génica, 258
Reumática, fiebre, 860, 868, 871
Reumatoide, artritis, 775, 819
Reumatoide, factor, 819
Reversión, 270
  test de Ames, 276
Revertiente, 270, 278
  mismo sitio, 270
  sitio secundario, 270
  verdadero, 270
Revertientes de un mismo sitio, 270
Reye, síndrome de, 884
R-Glucano, 676
Rhabdovirus, 256, 525-26, 907
Rhicadhesina, 679
R-Hidroxibutiril-CoA, 406
Rhinovirus, 524, 838, 882
Rhizobium, 226, 288, 337, 354, 598, 655, 672
Rhizobium fredii, 678
Rhizobium leguminosarum, 672, 678, 680-81, 683
Rhizobium trifolii, 92, 672, 678, 683
Rhizobium tropici, 670
Rhizopus nigricans, 971-72
Rhizopus, 482-83, 944
Rho, proteína, 190
Rhodobaca, 358
Rhodobacter, 238, 354, 358, 558-59, 598
Rhodobacter blasticus, 80
Rhodobacter capsulatus, 548-51
Rhodobacter sphaeroides, 88, 177-79, 358, 550
Rhodocyclus, 354, 358
Rhodocyclus purpureus, 358
Rhodoferax, 354, 358
Rhodomicrobium, 354, 358, 388, 598
Rhodomicrobium vanielii, 64, 358
Rhodophyta, 488-90
Rhodopila, 354, 358, 606
Rhodopila globiformis, 358
Rhodopseudomonas, 354, 358, 388, 598
Rhodopseudomonas acodophila, 358
Rhodospeudomonas palustris, 543
Rhodospirillum, 160, 354, 358, 598
Rhodospirillum centenum, 82, 89, 90
Rhodospirillum fulvum, 358
Rhodospirillum photometricum, 83
Rhodospirillum rubrum, 64
Rhodospirillum sodomense, 63, 93
Rhodotorula, 944
Rhodovulum, 354, 358
Ri, pásmido, 675-76
Ribavirina, 709
Riboflavina, 106, 124, 970
Ribonucleasa, 52, 53, 888
Ribonucleasa H, 535-36
Ribonucleótido reductasa, 132
Ribosa, 44, 46, 47, 132, 187
Ribosa 5-fosfato, 133-34
Ribosoma, 22, 23, 56, 168, 170, 712
  cloroplasto, 474
  estructura, 200, 201
  eucariótico, 201, 202, 470
  marco de lectura, 497-98
  mitocondrial, 474
  procariótico, 200, 201, 202
  sitio a, 200, 201, 202
  sitio e, 200, 2001
  subunidades, 200
  traslocación, 200-202
Ribosómica, proteína, 340
Ribosómico RNA (rRNA), 47, 168-69, 187
  16S, 322, 616-19
  árbol filogenético, 332-33
  Archaea, 445-46
  codificado en mitocondrias, 505
  mRNA, interacciones, 202
  PCR de rRNA dideoxi, método, 332
  procesamiento del RNA, 192
  rRNA "operon", 504, 505
  secuencias firma, 333-34
  secuencias y evolución, 332-33
  sonda filogenética, 333-34-35
  sondas para muestras naturales, 615-18
  traducción, 202
Ribotimidina, 198
Ribotipado, 322, 344, 834
Ribozima, 168, 193-94
Ribulosa monofosfato, ciclo, 366
Ribulosa, bifosfato carboxilasa (RubisCO), 444, 473, 555-56, 561, 641, 820
Ribulosa, bisfosfato, 555-56
Ricketts, Howard, 910
Rickettsia, 32, 337, 354, 381-83, 825-27, 832, 906
  características, 382
  filogenia, 382
  metabolismo, 382
  patogénesis, 382
Rickettsia prowazekii, 382, 505, 844, 910
Rickettsia popilliae, 381
Rickettsia rickettsii, 381, 382, 844, 910-11
Rickettsia typhi, 382, 910
Rickettsias, enfermedad por, 812, 909-11
  control, 912
  diagnóstico, 912
Rieske, proteína, 127
Rifamicina, 331, 709
  resistencia, 712
  síntesis, 961
Rifampina, 700-1, 705, 876-78
Rift Valley, fiebre, 859, 861
Rimantadina, 709
Río, 634-35
  oxígeno, 634-35
Ritonavir, 709, 901
Rizoplano, 671
Rizosfera, 625, 631, 671-72
RNA endonucleasa, 527
RNA polimerasa, 105, 168, 187-88, 190, 216-18, 537, 712
  Archaea, 191, 338-39-40
  Bacteria, 338-40
  bacteriófago T7, 518
  estructura, 187, 339
  eucariótica, 191
  Eukarya, 338-39-40
  I, 190
  inhibidores, 705, 709
  núcleo enzimático, 187
  poliovirus, 525
  RNA-dependiente, 244-45, 525-29
  virus específico, 246
10 RNA polimerasa 190
RNA, 1, 42, 43, 46 RNA, véase también Transcripción; Traducción
  antisentido, 225
  autorreplicativo, 325-26
  catalítico, 193, 203, 325
  determinación de secuencia, 305
  estructura, 47, 48, 187
  estructura cruciforme, 173, 191, 221-22
  estructura primaria, 47
  estructura secundaría, 47, 48, 173
  macromolécula de información, 169
  procesamiento, 168, 170, 192-93, 255
  propiedades de codificación, 169
  reguladora, 224-25
  replicasa, MS2 fago, 514
  vida, 194, 322, 325-6
  RNA, virus, 233, 244-46, 859-60
    bacteriófago, 513-14
    cadena negativa, 244, 246, 525-28
    cadena positiva, 244-45-46, 522-25
    de doble cadena, 234, 246, 256, 528-29
    mutación, 271
RNAsa P, 194
Roca sólida, 631
Rochalimaea, 382
Rochalimaea quintana, 382
Rochalimaea, vinsonii, 382
Rodamina B, 820
Rodococcus 283, 415
Rodospina, 637
Rodospinas sensoras, 448
Roentgen, 692
Ron, 976, 980-81
Ropa de fibra, 733, 752, 886
Roseta, 389-91
Rotavirus, 528, 825, 832, 835-36, 861, 955
Rothia, 415, 725
Rotura reductora del anillo, 591
Rous, sarcoma de, 258-59-60
rRNA, *véase* RNA ribosomal
Rubeola, 844, 856, 880-81
Rubeola, vacuna, 771, 854
Rubeola, virus, 825, 844
RubisCO, 444, 473, 555-56, 561, 641, 820 *véase* Ribulose bisfosfato carboxilasa
Rubrivivax, 358
Rumen, 8, 365, 594, 625, 650-54
  anatomía y acción, 650-51
  Bacteria, 651-52
  ciliados, 481
  dinámica de ecosistemas, 653-54
  espiroquetas, 434
  fermentación microbiana, 651-52
  hongos, 652-53
  protozoos, 652-53
Rumiantes, véase también Rumen 649
Ruminobacter amylophilus, 652-53
Ruminococcus, 398, 594, 721, 728
Ruminococcus albus, 651, 653
Rusticianina, 564
Rutenio, rojo, 92

S capa, 78-79, 91
S Parainfluenza, virus, 825
16S rRNA, 322, 616-17
Sabin,vacuna, 771
Saccharomyces bailii, 159
Saccharomyces carlsbergensis , 980
Saccharomyces cerevisiae, 23, 60, 123, 178-79, 226, 261, 334, 339, 485, 499, 504, 507, 534, 693, 976, 980
  vector de clonación, 995
  hospedador de clonación, 990
  expresión del gen, 509-10
  genoma, 504, 505-06
  genoma mitocondrial, 506
Saccharomyces ellipsoideus, 979
Saccharomyces rouxii, 159
S-adenosilmetionina, 227
Safranina, 58
Salado, lago, 160, 444-45
Salados, alimentos, 444-45
Salchicha, 8, 945
Salino, hábitat, 444-45
Salino, lago, 421
Saliva, 723
Salk, vacuna, 770-71
Salmonella, 283, 289, 354, 377-78, 585, 692, 713, 730-31, 733-34, 739-40, 842-43, 800, 803-4, 806, 810, 812, 825, 832, 834, 864, 944, 947, 948
  endotoxina, 81
  infección alimentaria, 951-52
  lipopolisacárido, 79, 80

- *Salmonella anatum*, 286
- *Salmonella enterica*, 283
- *Salmonella enteritidis*, 738, 875
- *Salmonella paratyphi*, 769, 863, 875, 939
- *Salmonella typhi*, 91, 811, 843, 845, 875, 928, 951
- *Salmonella typhimurium*, 83, 105, 693, 732, 865, 951
- Salmonelosis, 733, 856, 943, 950-51
- Salvarsán, 702
- Sánchez, Carmon, 18
- Sandwich ELISA, 824
- Sanger, Frederick, 18, 494, 515
- Sanger, procedimiento de los dideoxi, 305-6
- Sangre, 749-51
  - cultivo, 798-99
- Saquinavir, 709, 716, 900
- Sarampión, 836, 841, 844, 856, 861, 879-80
- Sarampión, vacuna, 771, 854-55, 879-80, 1001
- Sarampión, virus, 825, 835, 844
- *Sarcina*, 398-99
- *Sarcina ventriculi*, 399
- Sarcodina, 479-80
  - con concha, 480
- Sarcoma, 260
  - de Kaposi, 896-97
- Saturados, ácidos grasos, 157
- *Scenedesmus*, 488
- Schatz, Albert, 18
- Schaudinn, ER., 875
- Schick, test de, 812
- *Schizosaccharomyces pombe*, 178
- Schottmuller, H., 875
- *Schwartzia*, 652
- *Schwartzia succinovorans*, 653
- Scrapie, 261
- *Scytonema*, 418
- Seccionado fino, 62-63
- Secreción de proteínas, 204
- Secretora, inmunoglobidina A, 766
- Secretora, proteína, 203-4
- Secuela retardada, 571
- Secuencia,
  - mapear, 497
  - programas informáticos, 497
- Secuencia de bases, 619
- Secuencia signatura, 322
  - rRNA, 333
- Secundaria, estructura, 39
  - proteína, 51-52
  - RNA, 47, 48
- Secundaria, metabolito, 958, 960-61
  - superproducción, 960
- Secundaria, respuesta anticuerpo, 748, 767, 811
- Secundaria, sífilis, 892
- Secundario, fermentador, 411
- Secundario, tratamiento de aguas residuales, 930-31
- Segmentado, genomio, 527, 883
- Segmento G, bacteriófago Mu, 521
- Segundo revertiente, 270
- Selección, 265, 267, 278, 497
  - método de la penicilina, 267
  - negativa, 267
- Selección clonal, 748, 780, 789-90
- Seleccionable, marcador, 278
- Seleccionable, mutación, 266
- Selectiva, toxicidad, 696, 699
- Selectivo, medio, 797-98, 803
- Selenio, 105, 580-81, 664
- Selenito, 580
- Selenocisteína, 49, 197
- *Selenomonas*, 652
- *Selenomonas lactilytica*, 653
- *Selenomonas ruminantium*, 653
- *Seliberia carboxydohydrogena*, 365
- Semiconservativa, replicación, 168, 180
- Semilogarítmica, gráfica, 142
- Semiquinona, 125
- Semmelweis, Ignaz, 12
- Sensibilidad, 797, 816
- Señal, péptido, 999
- Señal, secuencia, 203-04
- Señal, transducción, 90, 224-27
- Septicemia, 797, 799-800
- Septicémica, peste, 919
- Septo, 139
  - formación, 139
- Serina transhidroximeti]asa, 592
- Serina, vía, 366, 592
- Serina,
  - código genético, 195
  - estructura, 49
  - fermentación, 584
  - síntesis, 133
- Serología, 748, 797, 816-18
- Serológical, pruebas, 811
- Serotonina, 774
- *Serratia*, 378-79, 804
- *Serratia marcescens*, 108, 379
- *Sesbania*, 682-83
- Setas, 469, 481-85, 982-83
  - producción comercial, 982-83
- Severa, inmunodeficiencia combinada, 1010
- Sexo y espiroplasmas, 410
- Sexual, actividad, 902
- Sexual, pelo, 291
- Sexual, preferencia, 852, 902
- Sexual, reproducción, 265, 475
- *Shewanella putrefaciens*, 580
- Shiga toxina, 863
- Shiga, K., 875
- *Shigella*, 81, 289, 377-78, 518, 585, 730, 740, 743, 800, 803, 832, 844, 952, 954
- *Shigella dysenteriae*, 378, 733, 843, 863, 875
- *Shigella flexneri*, 108
- *Shigella sonnei*, 935
- Shinake, 983-84
- Shine-Dalgarno, secuencia, 196, 201-02, 220, 497-98, 994-95
- Siálico ácido, 527
- SIDA, 245, 255, 258, 260, 485, 708, 715, 743, 769, 809, 811, 812, 823, 824, 832, 841, 843, 853, 858, 861, 875, 876, 890, 896-903, 923, 936,
  - carga vírica, 898
  - casos, 850-51
  - definición, 896-97
  - diagnóstico, 898
  - distribución por grupos, 851
  - epidemiología, 850
  - inmunoblot para VIH, 828-30
  - línea caliente, 902
  - mortalidad, 850
  - patogénesis, 896-903
  - pediátrico, 852
  - prevención, 852
  - transmisión, 850-52, 902
  - vacuna, 901, 1004
  - HIV-ELISA, 825, 828, 903
- Sideróforo, 103, 105, 106, 731, 734
- Siembra cruzada para ensayo de cepas productoras de antibióticos,
- Sífca, 490
- Sífilis, 431, 433, 832, 841, 844, 846, 856, 875, 890, 892-94
  - congenital, 892
  - primaria, 892
  - secundaria, 893
  - terciaria, 893
- Sigma, factor, 187-88-89
  - alternativa. 223
  - sigma-32, 70, 223-24
  - de T4, 249
- Silenciosa, mutación, 269
- Sílice chips, 509
- Silicona. 670
- Simazina, 668
- Simbiosis animal-*Bacteria*, 367
- Simbiosoma, 680
- Simbiótica, fijación de nitrógeno, 598, 655
- Simetría, ejes de rotación, 235-36
- Simmons, citrato, 806
- Simportador de sulfato, 72
- Simportadores, 71
- Sin Nombre, virus, 909
- Sincitios, 898
- Síndrome de Goodpasture, 775
- Síndrome de shock tóxico, 733, 777, 856, 860, 868, 886
- Síndrome hemolítico urético, 856
- Síndromes clínicos, vigilancia, 863
- Singlete de oxígeno, 164, 546, 753
- *Sinorhizobium*, 598, 677
- *Sinorhizobium meliloti*, 678-80
- Sintrofia, 540, 587-89, 625, 628, 646-49
- Sistema de aireación, fermentador, 961, 963
- Sistema de clasificación Baltimore, 529
- Sistema de distribución, agua, 934
- Sistema de respuesta sensorial, 88
- Sistema modelo, bacteriófago, 376, 488-90
- Sistema regulador de dos componentes, 207, 224-27
- Sistema regulador Nar, 226, 227
- Sistemática bacteriana, 19
- Sitio activo, 112, 209
- Sitio de empalme, 192
- Sitio de salida, 200-201
- Smith, Hamilton O., 18, 494
- Snow, John, 847
- Sódico, benzoato, 946
- Sódico, propionato, 945-46
- Sodio, 70
  - reduerimiento de los halófilos extremos, 446-47
  - requerimiento celular, 104
- Sodio, bomba de, 577
- Sodio, fuerza motriz de, 574-75
- Sodio-protón, antiportador, 72, 448
- Soja, 678
  - resistencia a glifosato, 1006-7
- Solapamiento de genes, 514-15, 518
- Solidificante, agente para medios de cultivo, 12, 13, 15
- Solución compatible, 138, 160-61, 442, 447
- Somatotropina (hormona del crecimiento), 1001
- *sopA* gen, 493
- *sopB* gen, 493
- Soper, George, 845
- *Sorangium*, 392
- Sórbico, ácido, 946
- Sorbosa, 372
- SOS, respuesta, 223, 254, 273-74
- Southern, E.M., 304
- Sparger, 961-62
- *Sphaerotilus*, 354, 362, 387-88, 391
- *Sphaerotilus natans*, 387, 564
- *Sphingonomas*, 354
- *Spirillum*, 64, 159, 354, 383-87
- *Spirillum volutans*, 162, 384-85
- *Spirochaeta*, 30, 32, 64, 352-53, 431-35
- *Spirochaeta aurantia*, 432
- *Spirochaeta plicatilis*, 432
- *Spirochaeta stenostrepta*, 64, 432
- *Spirochaeta zuelzerae*, 432
- *Spirogyra*, 473, 488
- *Spiroplasma*, 409-10
- *Spiroplasma citri*, 410
- *Spirulina*, 418
- Spliceosome, partícula procesadora, 192, 193
- *spo* genes, 98
- Sporichthya, 415
- *Sporocytophaga*, 427-28, 594, 608
- *Sporocytophaga myxococcoides*, 428, 594
- *Sporohalobacter*, 403
- *Sporolactobacillus*, 403
- *Sporomusa*, 403
- *Sporomusa malonica*, 586
- *Sporomusa paucivorans*, 574
- *Sporosarcina*, 403, 407-8
- *Sporosarcina halophila*, 407
- *Sporosarcina ureae*, 407-8, 608
- *Sporothrix schenckii*, 921-22
- *Sporotrichium*, 944
- Spur (inmunodifusión), 817
- src gen, 260
- ssp genes, 98
- Stanley, Wendall, 18
- *Staphylococcus*, 159, 283, 289, 295, 398-99, 704, 721, 722, 726, 727, 731, 735, 800, 804, 805, 834, 853, 869, 875, 879
- *Staphylococcus aureus*, 59, 160, 399, 666, 712, 721, 728, 733, 735, 738, 739, 753, 754, 777, 798, 800, 804, 805, 819, 825, 832, 853, 860, 863, 869, 870, 885-86, 947, 948, 965
  - genoma, 499
  - pared celular, 74, 76
  - resistencia antimicrobiana, 714
- *Staphylococcus epidermidis*, 399, 799, 804, 885, 886
- *Staphylococcus saprophyticus*, 799
- *Staphylothermus*, 458-59, 463
- *Staphylothermus marinus*, 463
- *Stella*, 387-88
- *Stephanodiscus*, 473
- Stetter, Karl, 18
- *Stetteria*, 459
- Stickland, reacción, 352, 407
- *Stigmatella*, 392, 395
- *Stigmatella aurantiaca*, 393
- *Stomatococcus*, 398
- Str1, 600
- Str2, 600
- *Streptococcus*, 30, 106, 159, 283, 295, 400-2, 585, 721, 729, 735, 804, 812, 869, 875, 879, 944, 948
- *Streptococcus bovis*, 653
- *Streptococcus hemolyticus*, 141
- *Streptococcus lactis*, 402
- *Streptococcus mitis*, 723, 743
- *Streptococcus mutans*, 723-25, 731, 742-43
- *Streptococcus pneumoniae*, 65, 280, 714, 728, 732-33, 754, 832, 843, 856, 869, 872, 875
- *Streptococcus pyogenes*, 162, 714, 731, 733, 735, 754, 777, 798, 805, 815, 819, 832, 860, 863, 869, 870-72, 886
- *Streptococcus sanguis*, 723, 743
- *Streptococcus sobrinus*, 723-25, 742-43
- Streptocócica, enfermedad, 856, 870-71
  - diagnóstico, 871-72
- *Streptomyces*, 289, 606, 710, 713, 960
  - aislamiento, 415-17
  - características, 414
  - ecología, 415-19
  - producción de antibióticos, 417-18
- *Streptomyces aureofaciens*, 418, 968-69
- *Streptomyces coelicolor*, 178, 417, 498
- *Streptomyces erythreus*, 418, 964
- *Streptomyces fradiae*, 418, 964
- *Streptomyces griseus*, 418, 964
- *Streptomyces kanamyceticus*, 964
- *Streptomyces lincolnensis*, 418, 964
- *Streptomyces lividans*, 186
- *Streptomyces nodosus*, 418
- *Streptomyces noursei*, 418, 964
- *Streptomyces orchidaceus*, 964
- *Streptomyces rimosus*, 964

- *Streptomyces thermoautotrophicus*, 599-602
- *Streptomyces venezuelae*, 418, 964
- *Streptosporangium*, 415
- *Streptoverticillium*, 415
- *Strigonema*, 418
- *Stygiolobus*, 458-59
- Subclínica, infección, 840
- Subclonación, 497
- Subcutánea, micosis, 922
- Submarino, hábitat volcánico, 460-62
- Subtilisina, 290
- Subunidad estructural, 234
- Subvíricas, partículas, 529
- Succinato,129, 411-12, 581, 590
  - bioquímica de la fijación de nitrógeno, 682
  - fermentación, 411, 584, 586
  - metabolismo, 595-96
  - producción en el rumen, 652-53
  - producto de fermentación, 376, 585, 646-47
- Succinil-GOA, 129, 411, 583-84
- *Succinimonas amylolytica*, 653, 682
- Suelo,
  - actividad del agua. 159, 632
  - anegado, 658
  - ciclo del nitrógeno, 655
  - columna de Winogradsky, 609-10
  - como hábitat microbiano, 630, 631-32
  - formación, 630-31
  - horizonte, 631
  - metanogénesis, 649
  - microbiología del, 17
  - mineral, 630
  - nutrientes, 632
  - orgánico, 630
  - partículas, 627, 631-32
  - perfil, 631
  - solución, 632
  - *Streptomyces*, 415-16
- Suero, 748-49, 771, 959
- *Suillus bovinus*, 674
- Sulfamidas, 701
- Sulfanilamida, 701-703
- Sulfato, 626
  - aceptor de electrones, 454, 571-74
  - ciclo del azufre, 656-57
  - donador de electrones, 560
  - reducción, 558-59, 656-57
  - asimilativa, 571-71, 656
  - desasimilativa, 571-72, 656
  - medida en la naturaleza, 610, 612, 620
  - respiración, 568
- Sulfito,
  - desproporción, 573
  - en alimentos, 946
  - oxidasa, 105, 562
  - producción en la reducción de sulfato, 571
  - reducción, 571
  - reductasa, 571
- Sulfolobales, 459-60
- *Sulfolobus*, 158, 282, 296, 443, 458, 464, 557, 562, 663
- *Sulfolobus acidocaldarius*, 339, 461, 562, 614
- *Sulfolobus solfatarius*, 178
- Sulfonamida, 701, 703
  - resistencia, 712
- *Sulfophobococcus*, 459
- *Sulfurisphaera*, 459
- Sulfuro,
  - aceptor de electrones, 571
  - microelectrodo, 621
  - oxidación, 551, 622, 656-57, 661
  - tierra primitiva, 323
  - toxicidad, 657
- *Sulfurococcus*, 459
- *Sulfurospirillum*, 396
- sup35 proteína, 262
- Superantígeno, 773, 776-77, 886, 948
- Superantígeno toxina, 735, 739-40
- Superantígenos, 78-85
- Superficial, micosis, 922
- Superficie, 628-29, 631
  - apéndices, 734
  - área, 65
  - soportes para polimerizaciones prebióticas, 324
- Superficie/volumen, relación, 65, 391
- Superoperón, 551
- Superóxido, anión, 753
- Superóxido, dismutasa, 105, 164-65
- Superóxido reductasa, 164-65
- Supresora, mutación, 270
- Sustituciones de pares de bases, 269
- Sustrato, 112
- Sustratos de partida, 590
- SV40, virus, 234, 529-31
  - células no permisivas, 530
  - células permisivas, 530
  - genoma, 529
  - mapa genético, 530
  - vector de donación, 995
- Sym plásmido, 680-81
- *Synechococcus*, 418
- *Synechococcus lividus*, 418
- *Synechocystis*, 418, 547
  - *dnaE* gen, 503
  - genoma, 499
- *Synercid*, 713
- *Syntrophobacter*, 354, 647
- *Syntrophobacter wolinii*, 647
- *Syntrophomonas*, 587-88, 647
- *Syntrophomonas wolfei*, 588, 647
- *Syntrophospora*, 403
- *Syntrophus gentiane*, 647

- **T -DNA,** 675-77, 987, 1005
- T -impar, bacteriófago, 518-19
- T, 174
- T2, bacteriófago, 243
- T3, bacteriófago, 243
- T4, bacteriófago, 232, 236-37, 242-43, 247-50
  - proteínas medianas, 248
  - proteínas tardías, 248
  - proteínas tempranas, 248
  - replicación de, 247-50
  - transcripción, traducción, y elongación, 248-50
- T6, bacteriófago, 243
- T7, bacteriófago, 243, 247
  - cola, virus, 242
  - mapa genético, 518
  - replicación, 518-20
- *tac* promotor, 993
- Talasemia, 906, 918
- Tallo negro, 482
- Tamaño de la explosión, 241
- Tampón, 159, 886
  - fosfato, 159
- Taninos, 979
- Taq polimerasa, 157, 313
- Taql, 302
- Tar, transductor, 227
- Tatum, Edward L., 18, 280
- Taxias, 87-91
  - fototaxis, 87, 90-91
  - otras, 91
  - quimiotaxis, 87-89
- Taxonomía, 322, 341-45
  - clásica, 341-42
  - GC porcentaje, 341
  - halófilos extremos, 445-46
  - hibridación DNA:DNA, 342
  - molecular, 342-45
- Técnicas *in vitro*, 301-315
  - bacteriófago lambda como vector de clonación, 310-11
  - clonación molecular, 307-308
  - DNA sintético, 306-7
  - enzimas de restricción, 302-305
  - mutagénesis dirigida, 314-315
  - plásmidos como vector de clonación, 308-309
  - reacción en cadena de la polimerasa, 312-314
  - secuenciación del dna, 305-6
- Teflón, 670
- Tegumentos, herpesvirus, 531
- Teicóicos, ácidos, 76, 77
- Telomerasa, 186, 193
- Telómero, 177-78, 186, 503
- Temin, Howard, 18
- Temperatura,
  - cardinal, 138, 151-52
  - clases de organismos, 152
  - efecto en la estructura del DNA, 174
  - efecto sobre el crecimiento, 141-57
  - límites superiores para el crecimiento, 157
  - límites superiores para la vida, 40, 642-43
  - máxima para el crecimiento, 151
  - mínima para el crecimiento, 151-52
  - óptima, 151
  - tierra primitiva, 324
- Teñir, células tintadas, 58
- Terbenafina, 710
- Termita, 649-50
- Termoacidófilo, 34
- Termoclina, 634
- Termófilo, 138, 152, 155
  - adaptaciones moleculares, 156-57
  - aplicaciones biotecnológicas, 157
  - cultivo de enriquecimiento, 608
- Termoplasmatales, 451-52
- Termoproteales, 461-62
- Termosoma, 428, 463
- Terramicina, véase Oxitetraciclina
- Terrestre, ambiente, 630-33
- Test bactericida, 812
- Test de floculación, 812
- Testas, 480
- Tetánica, vacuna, 771, 854-55, 924
- Tetánica,toxina, 732, 737-38, 923-24
- Tetánico, toxoide, 771
- Tétanos, 407, 733, 743, 840-41, 856, 875, 906, 923-24
  - control, 924
  - diagnóstico, 924
  - epidemiología, 923
  - patogénesis, 924
  - prevención y tratamiento, 924
- Tetraciclina, 688, 700, 704, 707, 715, 807, 887, 910, 912-13, 958
  - estructura, 707
  - modo de acción, 202, 707
  - producción comercial, 964
  - producción, 418
  - resistencia, 309, 712
  - síntesis, 960
- Tetracloroetileno, 582
- Tetraétcer, lípido, 453
- Tetrahidrofolato, 575
- *Tetrahymena*, 193-94
- *Tetrahymena thermophila*, 178
- Tetrametilamonio, 366
- Tetranactina, 700
- Tetrapéptido del glicano, 74, 76
- Textil, industria, 699
- Thayer-Martin, agar, 799, 801
- *The Prokaryotes*, 349
- *Thelophora terrestris*, 674
- *Themobispora*, 415
- *Thermoactinomyces*, 97, 415
- *Thermoanaerobacter*, 403, 415
- *Thermocladium*, 459
- *Thermococcus*, 336, 442, 453, 458-59
- *Thermococcus celer*, 453
- *Thermocrinus*, 439-40
- *Thermocrinus ruber*, 438
- *Thermodesulfobacterium*, 353, 396, 437
- *Thermodesulfobacterium mobile*, 437
- *Thermodesulforhabdus*, 396
- *Thermodesulfovibrio*, 439
- *Thermodiscus*, 459
- *Thermofilum*, 458, 461-62
- *Thermofilum librum*, 461
- *Thermomicrobium*, 436
- *Thermonospora*, 415
- *Thermophilum*, 459
- *Thermoplasma acidophilum*, 451-52
- *Thermoplasma*, 34, 78, 158, 336-37, 442-43, 451-53
- *Thermoplasma volcanium*, 451-52
- *Thermoproteus neutrophilus*, 461
- *Thermoproteus*, 443, 458-59, 557
- *Thermosphaera*, 459
- *Thermotoga*, 32, 336, 353, 437, 465
- *Thermotoga maritima*,
  - genoma, 499
  - rutas metabólicas, 501
  - sistemas de transporte, 501
  - transferencia génica horizontal, 502
- *Thermus*, 283, 435-36
- *Thermus aquaticus*, 157, 302, 313, 435, 459
- Theta replicación, 181, 287, 516, 530
- *Thioalkalicoccus*, 356
- *Thiobacillus*, 158, 354, 360-61, 563, 598, 608, 641, 656-57
- *Thiobacillus denitrificans*, 361, 608
- *Thiobacillus ferrooxidans*, 360-61, 563-64-65, 608, 659-64
- *Thiobacillus intermedius*, 361
- *Thiobacillus neapolitanus*, 361-62
- *Thiobacillus novellus*, 361
- *Thiobacillus thiooxidans*, 361, 664
- *Thiobacillus thioparus*, 361
- *Thiocapsa*, 356-57, 606
- *Thiocapsa* roseopersicina, 64
- *Thiococcus*, 356
- *Thiocystis*, 356-57
- *Thiodictyon*, 356
- *Thioflavicoccus*, 356
- *Thiohalocapsa*, 356
- *Thiolamprovulum*, 356
- *Thiomicrospira*, 354, 361, 641
- *Thiopedia*, 356
- *Thiopedia rosea*,357
- *Thiopedia roseopersicinia*, 357
- *Thioploca*, 361, 363
- *Thiorhodococcus*, 356
- *Thiorhodospira*, 356
- *Thiorhodovibrio*, 356
- *Thiosphaera*, 361
- *Thiospirillum*, 354, 356, 384
- *Thiospirillum jenense*, 90, 357, 610
- *Thiothrix*, 361, 363, 561, 641
- *Thiovolum*, 354, 361, 641
- Ti plásmido, 625, 675-77, 987, 1005
- Tiamina, 106, 727
- Tiempo de muerte térmica, 689
- Tierra,
  - incultivable, 421
  - primitiva:
    - condiciones, 323
    - microorganismos, 323
    - origen de la vida, 323-24, 465-66
  - origen del planeta, 322-23
  - uso, 859
- Tifus, 381-82, 744, 844, 857, 906, 909-10
- Tilacoide, 422, 469, 473, 540, 542
- Tilosina, 707
- Timina, 46, 47, 48, 171-72, 187, 703
- Timo, 750, 789, 791
- Tinción, 613-14
  - cápsula, 91-92
  - de Gram, 58-59
  - de viables, 613
  - diferencial, 58
  - endospora, 96
  - filogenética, 615-16

  genética, 615-17
  muestras naturales, 613-14
  negativa, 63
  para microscopio, 58-59
  tinción fluorescente, 613-14
    usando anticuerpos, 613-14
    usando DAPI, 613-14
Tintado fluorescente, 613-14
Tioéster, 41
Tioglicolato, 163
Tioglicolato, caldo, 163
Tiosulfato:
  aceptor de electrones, 571
  donador de electrones, 551, 560
Tipo silvestre, 266
Tirocidina, 404
Tirosina:
  código genético, 195
  estructura, 49
  fermentación, 584
  síntesis, 133, 210
Título, anticuerpo, 767, 770, 797, 811
Tivelosa, 80
Tizón del castaño, 482
Tobramicina, 701, 807

Togavirus, 256
Tolerancia, 748, 756, 780, 789-90
Tolueno, 580, 590-91
Tolueno dioxigenasa, 591
Tonegavva, Susumu, 18
Topoisomerasa 176-77, 183
Torula, 944
Torulopsis, 729
Torunda, 797-98
Torunda de la garganta, 798
Torundas rectales, 799
Tos, 846, 869, 883
Tosferina, véase Pertusis
Toxicidad, 720, 729, 732-33
Toxina A-B, 735-738
Toxina botulínica, 737-38, 864, 950
Toxina citolítica, 735
Toxina síndrome de shock tóxico, 863, 886
β-toxina, 733
λ toxina, 733
γ-toxina, 733
Toxinas, véase también Endotoxina; Enterotoxina; Exotoxin
  armas biológicas, 864-65
  ensayo de neutralización, 817
  plásmidos de virulencia, 289-90
Toxoide, 770
Toxol, 710
Toxoplasma, 479
Toxoplasma gondii, 862, 897, 948, 955
Toxoplasmosis, 479, 827, 862, 896-97, 955
toxR gen, 739
tra región, 288, 291
Tracoma, 423-24, 832, 860, 893
Tracto respiatorio inferior, 720, 728-29, 869
Tracto respiratorio superior, 720, 728-30
Traducción, 3, 5, 168, 169-70, 200-02
  acoplamiento a la transcripción, 221-22, 229
  antibióticos que la inhiben, 202
  bacteriófago T4, 248-50
  elongación, 200-01
  eucariótica, 170
  iniciación, 196, 200-01
  inversa, 987, 998-99
  pasos, 200
  procariótica, 170
  reiniciación, 515
  terminación-liberación, 200-02
Transaminasa, 133, 910
Transcarboxilasa,105, 411
Transcripción, 3, 5, 168-69-70, 187-92, 509
  bacteriófago T4, 248-50
  dirección, 187, 318
  elongación, 187
  eucariótica, 170
  iniciación, 187-90
  inversa, 170, 232, 245, 258, 513
  in situ (ISRT), 624-25
  procariótica, 170
  regulación, 211-28
  sitio de pausa, 222
  terminación, 190-91, 221-22
  terminador, 188, 190-91, 994
    intrínseco, 190
  traducción acoplada, 221-22, 229
  unidad de, 191-92
Transducción, 265, 278-79, 283-86
  descubrimiento, 281
  especializada o restringida, 283, 284-86, 310
  generalizada, 283-84-85
  mapa genético, 316
Transductor, 227-28
Transductora, partícula, 283-84-85
Transfección,282-83, 990
Transferencia DNA, 675-77, 987, 1005
Transferencia génica horizontal (lateral), 318, 322, 335-36, 347, 494, 502
Transferencia lateral de genes, 322, 335-336, 347
Transferencia RNA (tRNA), 47, 168-69, 187, 197-99
  asa auticodón, 198
  asa D, 198
  bacteriófago T4, 248-50
  bases modificadas, 197-98
  brazo aceptor, 198-99
  cargado, 199
  codificado en mitocondrias, 505
  estructura, 197-98
  estructura cruciforme, 198
  iniciador, 200
  iniciador para la transcripción inversa, 259-60
  procesamiento del RNA, 192
  traducción, 200-02
  TtpC círculo, 198
Transferrina, 731
Transformación,
  celular (por virus), 238, 256, 258, 260, 530
  competencia, 279
  descubrimiento, 280
  en bacterias, 83, 232, 265, 278, 308
  en eucariotas, véase Transfección
  incorporación de DNA, 280-81
  integración de DNA, 281-82
  mapeo genético, 316
Transfusión de sangre, 818, 851, 852
Transgénica planta, 1005
Transgénico, animal, 1008
Transgénico, organismo, 987, 1005
Translocación (mutación), 271
Translocación de grupo, 56, 71, 72
Translocación en la traducción, 201
Translocasa, 73-74
Transmembranal, proteína, 81
Transmisión, 840, 845-47 véase también Enfermedad alimentaria
  controles dirigidos a, 854
  directa hospedador a hospedador, 846
  hospedador a hospedador, 843-45,
  indirecta: hospedador a hospedador, 846
  infecciones nosocomiales, 852-53
  persona a persona, 842
  por aire, 846, 868-884
  zoonosis del aire, 846, 868-84
Transpeptidación,138, 141-42
Transpeptidasa, 706
Transpiración, 722
Transponible, elemento, 177, 179, 265, 297-98
  bacteriófago Mu, ver Mu bacteriofago
  eucariótico, 298
  procariótico, 298
Transponibles, bacteriófagos, 520-21
Transportador 842-43
  agudo, 842
Transportador ABC, 56, 71-73, 501
Transportadores de átomos de hidrógeno, 117
Transportadores de un carbono en la metanogénesis, 859
Transporte:
  a través de la membrana citoplasmática, 70-74
  activo, 842
  activo, psicrofilia, 154
  de proteínas al exterior, 73-74
  mediado por transportador, 70-71
    efecto de saturación, 70
    especificidad, 70-71
  permeasa Lac, 72
  proteína al exterior, 73-74
  sistema ABC, 72-73
  translocación de grupo, 72
  y su contribución a la emergencia de patógenos en el mundo,
Transposasa, 298-300, 521
Transposición, 271, 297
  conservativa, 299
  descubrimiento, 298
  mecanismo, 298-300
  replicativa, 299
Transposón, 179, 265, 297-301, 508
  conjugativo, 298
  factores de virulencia, 863
  mutagénesis, 275, 300-01
  Tn 10, 300
  Tr15, 298
Transposones compuestos, 298
Trasiego, 980
Tratamiento de aguas terciario, 931-932
trc promotor, 993-94
Trehalosa,160-61
Treonina:
  código genético, 195
  estructura, 49
  fermentación, 584
  síntesis, 133
Treponema, 433-34, 574
Treponema denticola, 434
Treponema macrodentium, 434
Treponema oralis, 434
Treponema pallidum, 433-34, 812, 827, 832, 844, 846, 858, 875, 890, 892, 913
Treponema saccharophilum, 434
Tricercomitis, 650
Trichinella spiralis, 947
Trichodesmium, 636-37
Trichomonas, 478, 480
Trichomonas vaginalis, 472, 832, 844, 890, 895
Trichophyton, 930
Tricloroetileno, 582, 669
Tricocisto, 480
Tricomónada, 336
Tricomoniasis, 832, 844, 890, 895-96
Trifluridina, 709
Trifolium repens, 680
Triglicérido, 45-46
Trimetilamina, 366, 449, 580-81
Trimetilamina, óxido, (TMA),366, 580-81
Trimetilsulfonio, 366
Trimetoprim, 701
Trimetoprim-sulfametoxazol, 807
Triosa-fosfato, 400
Tripanosomas, 479
Tripanosomiasis, 832, 841
Tripéptido, 51
Triple enlace, 40
Triple oxígeno, 163-64
Triplex DNA, 225
Triptófano, tRNA, 260
Triptófano:
  código genético, 195
  estructura, 49
  fermentación, 584
  permeabilidad de membranas, 70
  síntesis, 133, 210, 220-22
Triquinosis, 856
Trisacárido, 44
Trismo, 738
tRNA, véase RNA de transferencia
Trofosoma, 641-42
Trofozofo,936-37, 939
trp operón promotor, 993
trp operón, 220-22
trp proteína de atenuación, 222
trp represor, 213
Trypanosoma, 479-80, 832
Trypanosoma brucei, 507
Trypanosoma gambiense, 479
Tsetse, mosca, 479
Tuberculina, 812, 875
Tuberculina, ensayo, 773, 775, 811, 863, 875-76
Tubérculo, 875
Tuberculosis, 692, 699, 703, 706, 744, 753, 832, 841, 843, 844, 856, 860, 874-75, 896
  bovina, 842, 854, 877
  control, 876
  patología, 875-76
  primaria, 875-76
  reinfección. 875-76
  trabajo de Koch, 13-14
  tratamiento, 876-77
  vacuna, 771
Tubería, biofilm, 630
Tubo de infección, 625, 679-80
Tubulina, 25, 139, 475
Tularemia, 844, 856
Tumor, 256
  benigno, 256
  factor necrosante, 1001
  gen supresor, 257
  maligno, 256 véase Cáncer Tumor,
  virus, 260, 530-31
Tungsteno, 105
Turbidez, medidas, 148-49
  curva estándar, 148-49
Ty1, 534
Ty3, 534
Tyndall, John, 10

Ubiquinona, 566
UDPG, véase Uridín difosfoglucosa
Úlcera gástrica, 885-86
Ultravioleta, radiación:
  esterilización, 692
  mutagénesis, 272-73
  tierra antigua, 323
*umu*D gene, 274
Undecaprenolfosfato, véase Bactoprenol
Unidad de membrana, 66
Uniportador, 71-72
Universal antecesor, 3, 27, 335
Universal código, 196
Uracilo, 46, 187, 703
Uranio, 663-64
Urea, 619
  degradación, 407-8
  medio de cultivo,
Ureaplasma, 410
Ureaplasma urealyticum, 890
Ureasa, 105, 379
  ensayo, 805
Ureido, 682

Uretra, biota normal, 729
Uridilato, 133-34
Uridín difosfoglucosa (UDPG), 132
Urogenital, tracto:
  anatomía, 728
  biota normal, 721
Uroquinasa, 1001
Ustilago maydis, 505

V gen, 785
Vacuna, 12, 532, 770 véase también enfermedades específicas antígeno libre
  antígeno recombinante, 772
  conjugado, 771
  de la varicela, 771
  DNA, 772-73
  en plantas, 1007
  genéticamente manipulada, 533, 1001-1005
  neumonía bacteriana, 771
  péptido sintético, 772
  polivalente, 884, 1002
  producción, 732
  recombinante, 1001
  vector recombinante, 772
  virus, 533, 709, 995
    genéticamente modificada, 772
    vacunas vivas recombinantes, 1002
Vacunas de subunidades, 901, 1003
Vagina, microbiota, 729
Vaginal, infección, 484
Valaciclovir, 709
Valencia, inmunoglobulina, 766
Valerato, 653
Valil-tRNA sintetasa, 199
Valina,
  código genético, 195
  estructura, 49
  fermentación, 584
  síntesis, 133
Valinomicina, 700
Vampirococcus, 385
van der Waals, fuerzas de, 40
van Ermengem, E.M.P., 875
van Niel, C.B., 18
Vanadio, 105, 374
Vancomicina, 700, 704, 706, 715
Vanillina, 676
Varicela, 531, 850, 856, 881
Varicela-zoster, virus, 531
VDRL, ensayo, 812
Vector de reemplazamiento, 310
Vector integrado, 987, 995
Vector lanzadera, 987, 993
Vector, patógeno, 839, 844
Vectores de virus, 995
Vegetariano, queso, 1004
Vehículo, 839, 846
Veillonella, 609, 721
Vena, 749, 751
Venter, J. Craig, 18, 494
Verdadero revertiente, 270
Verotoxina, 952
Verrucomicrobium, 353, 427
Verrucomicrobium spinosum, 427
Verrugas genitales, 832, 890
Vesícula, Frankia, 684
Vesicular, estomatitis, 533
Vi antígeno, 378, 734
Viabilidad, 613-14
Viable, célula, 138, 144, 146
Viables, recuento de, 146-47, véase también recuento en Placa
  muestras naturales, 613-14
Viaje,
  inmunización, 857-58
  patógeno, 859-60
Vías de las hexosas difosfato, 584
Vías de las hexosas monofosfato, 584
Vibrio, 159, 289, 301, 354, 379-80
Vibrio cholerae, 380, 630, 730, 733, 738-39, 742-43, 812, 827, 843, 860, 862-63, 875, 935-36, 939
  tipo clásico, 935
  tipo El Tor, 935
Vibrio fischeri, 160, 224, 380
Vibrio parahaemolyticus, 380
Vidarabina, 710
Vida,
  árbol universal, 322, 335-36
  características esenciales, 3, 4
  origen sobre la tierra, 323-24, 465-66
Vigilancia, 839, 855, 863
Vinagre, 974-75
  destilado, 974
  método de goteo, 975
  método de la tinaja abierta, 975
  método del burbujeo, 975
  producción comercial, 372, 975
Vinblastina, 711
Vincristina, 710
Vino, 123, 958, 976, 978-80
  blanco, 978-80
  dulce, 978
  espumoso, 978
  fortificado, 978
  pasteurización, 691-92
  rojo, 978-80
  seco, 978
  tinto, 978-80
Violaceína, 375
vir genes, 676
Virginiamicina, 339
Viricídico, agente, 688, 696
Virión, 232-33-34, 237, 257, 513
Viristático, agente, 688, 696
Viroide, 232, 261-62
Viruela, 855, 865
Viruela, virus, 234, 532-33
Virulencia, 720, 729, 732-34
  factor, 732-35, 862-63
  plásmido, 289-90
Virulento, virus, 232, 247-50
Virus, 19, 23, 24, 179, 231-63, 513, véase también Bacteriófago; virus DNA; virus RNA; virus específicos
  atemperado, 232, 247
  autoensamblaje, 234
  bacteriano, véase Bacteriófago
  Clase VI, 534
  Clase VII, 534-35
  clasificación Baltimore, 244-45
  comparación con las riquetsias y clamidias, 427
  complejo, 236
  con DNA y envoltura, 532
  con envoltura, 235-36, 525, 531
  control de crecimiento, 708-709
  críptico, 251
  cuantificación, 238-40
  cultivo, 836
  de animales, 255-58
    y cáncer, 256-58
    cultivo celular, 237-38
    clasificación, 255-56
    consecuencias de la infección, 256
    DNA, 529-30
    DNA de doble cadena, 256
    RNA de doble cadena, 256, 528-29
    infección latente, 256
    infección lítica, 256
    RNA de polaridad negativa, 525-27
    infección persistente, 256
    ensayo en placa, 240
    RNA de polaridad positiva, 524-25
    DNA monocatenario, 256
    RNA monocatenario, 256
    transformación, 256
  de la viruela aviar, 532, 771, 854, 864
  del catarro, 524
  del mixoma del conejo australiano, 848-49
  del mosaico del guisante, 234,
  del mosaico del tabaco (TMV), 235, 522-23
  desnudo, 235
  ELISA, 835
  empaquetamiento del ácido nucleico, 240-41
  en procariotas y eucariotas, 255
  enfermedad transmitida por alimentos, 948, 954-55
  enfermedad transmitida por el agua, 939
  ensamblaje, 240-41
  ensayos de aglutinación, 835
  envuelta de, 235-36, 525-26, 531
  fase extracelular, 232-33
  fase intracelular, 233
  fungoideo, 261, 534
  genomio, 233-34, 246-48
  helicoidal, 235
  hospedador, 232-33, 237-38
  icosaédricos, 235-36,
  infección, 233, 856
  infecciones respiratorias, 879-81
  inhibición química, 708-709
  interferencia, 108
  interferón para control, 708-709
  liberación, 240-41, 515-16-17
  linfotropo B humano (HBLV), 822
  material genético, 233
  membrana, 235
  meningitis, 879
  métodos de diagnóstico, 824-26, 835-36
  microscopía electrónica, 835
  mosaico de la coliflor, 234, 258, 535
  multiplicación, 241-46
  partícula, 233-37
  penetración, 240-41-42
  polimórfico, 527
  proteasa codificada por, 523
  proteinas, 246
  proteinas tardías, 246
  proteinas tempranas, 246
  replicación, 185-86, 232, -46
  resistencia, 269
  restricción y modificación por el hospedador, 242-43
  RNA, 859-61
  simetría, 235
  sondas de ácidos nucleicos, 834
  tamaño, 234
  transcriptasa inversa, 534-38
  transductor, 283-86
  unidad de infección, 238
  vacuna recombinante1001-1003,
  virulento, 232, 247-50
Vitamina, 105, 113
  producción comercial, 969-70
Vitamina B 12 106, 575, 727
  estructura, 969
  producción comercial, 969-70
Vitamina B1, véase Tiamina
Vitamina B6, 106
Vitamina K, 106, 125, 377, 727
vnfHDK genes, 602
Vodka, 976, 980-81
Voges-Proskauer,ensayo, 805
Volátiles, ácidos grasos, 65-60
Volatina, gránulos, véase Polifosfatos
Volcánico, hábitat, 458-60
Volta, Alessandro, 448-49
Voltereta, 87-88
Volvox, 35, 488
Voriconazol, 710
VP1, mapa genético, 530
VP2, mapa genético, 530
VPg proteína, 524-25
Vulvovaginal, candidiasis, 890

Waksman, Selman, 18
Watson, James, 18, 280
Welch, W. H., 875
Weichselbaum, A., 875
Whisky, 976, 980-81
Wilts, 371, 482
WIN52084, 882
Winogradsky, columna, 607, 609-10-11
Winogradsky, Sergei, 16, 17, 18, 561, 609
Wobble, 195
Woese, Carl, 18, 26, 330
Wolbachia, 382-83
Wolbachia pipientis, 383
Wolinella, 354
Wolinella succinogenes, 581
Wollman, Elic, 281
Woods, D.D., 702

Xanthobacter, 283
Xanthomonas, 354, 368, 371
Xantófila, 488-90
Xenobiótico, 625, 668-71
Xenococcus,418
Xerófilo, 138, 160
Xeromyces bispora, 159
X-gal, 495
Xilanasa, 593, 973
Xilano, 481-82, 593
X-Tirosina-X-X-X-X-leucina-X-X-X, 783
X-X-X-valina-X-X-X-prolina-X-X, 783

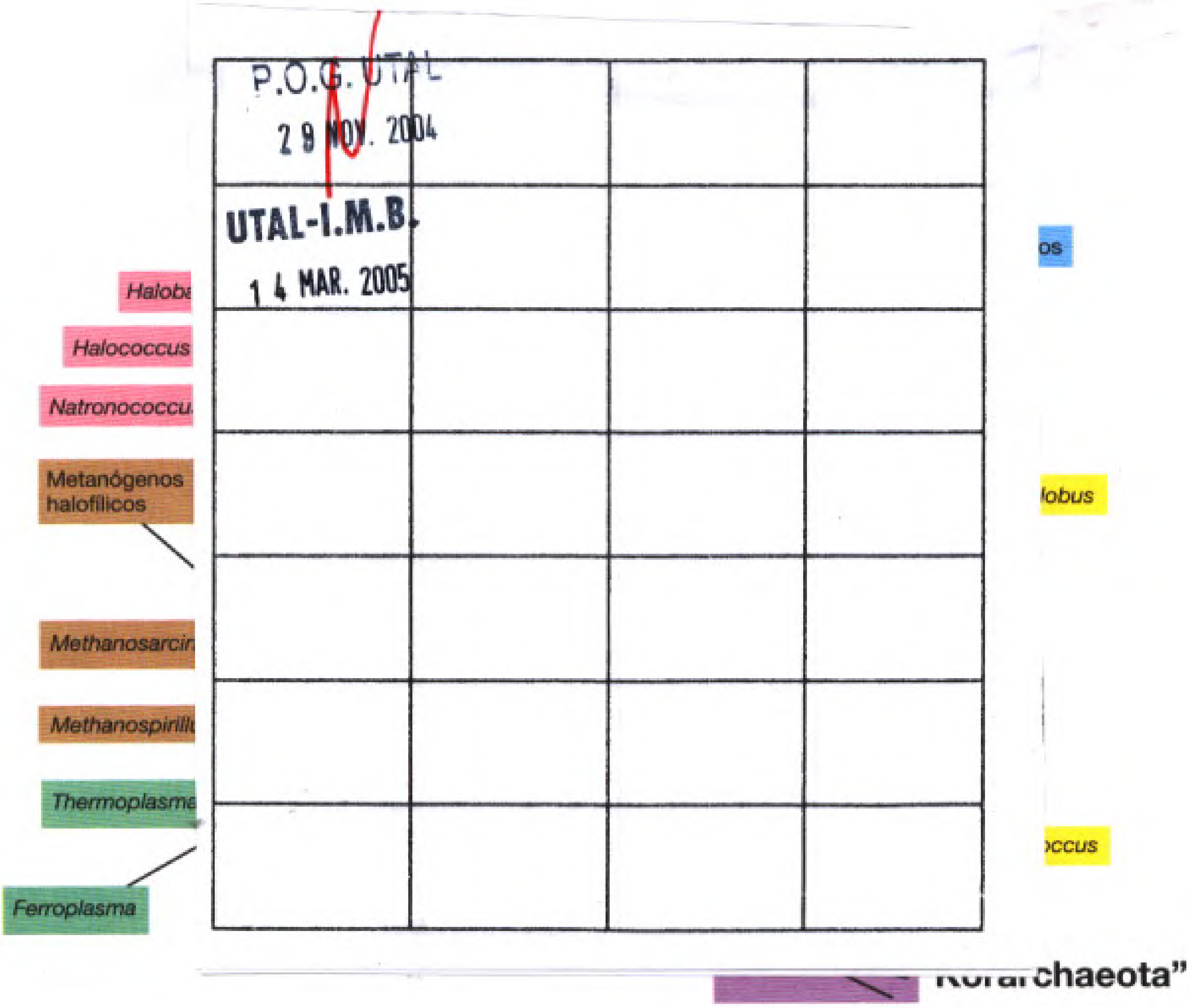
YAC, véase cromosoma artificial de levaduras
Yallow, Rosalyn, 18
y-Aminobutirato, 584
Yersin A., 875
Yersina, 290, 377, 825
Yersina enterocolítica, 948, 954
Yersina pestis, 844, 858, 863-64, 875, 918-19
Yodoro, compuesto 698
Yogur, 8

Z esquema, 553
Zalcitobina, 709
Zea mays, 505
Zeaxantina, 422
Zidovudina (AZT), 709
Ziehl-Neelsen, tinción, véase Ácido-alcohol resistente
Zigomicetos, 482
Zigoto, 475-476
Zimomonas, 354, 371, 585
Zinc, 105, 575, 664
Zinc, dedo, 213-14
Zinder, Norton, 18, 281
Zona de inhibición, 697
Zonas húmedas, metanogénesis, 649
Zoogloea, 462, 690
Zoogloea ramigera,931, 933
Zoonosis, 841-842, 854, 906
Zugm, lago, 444

FILOGENIA DE LOS SERES VIVOS-*ARCHAEA*

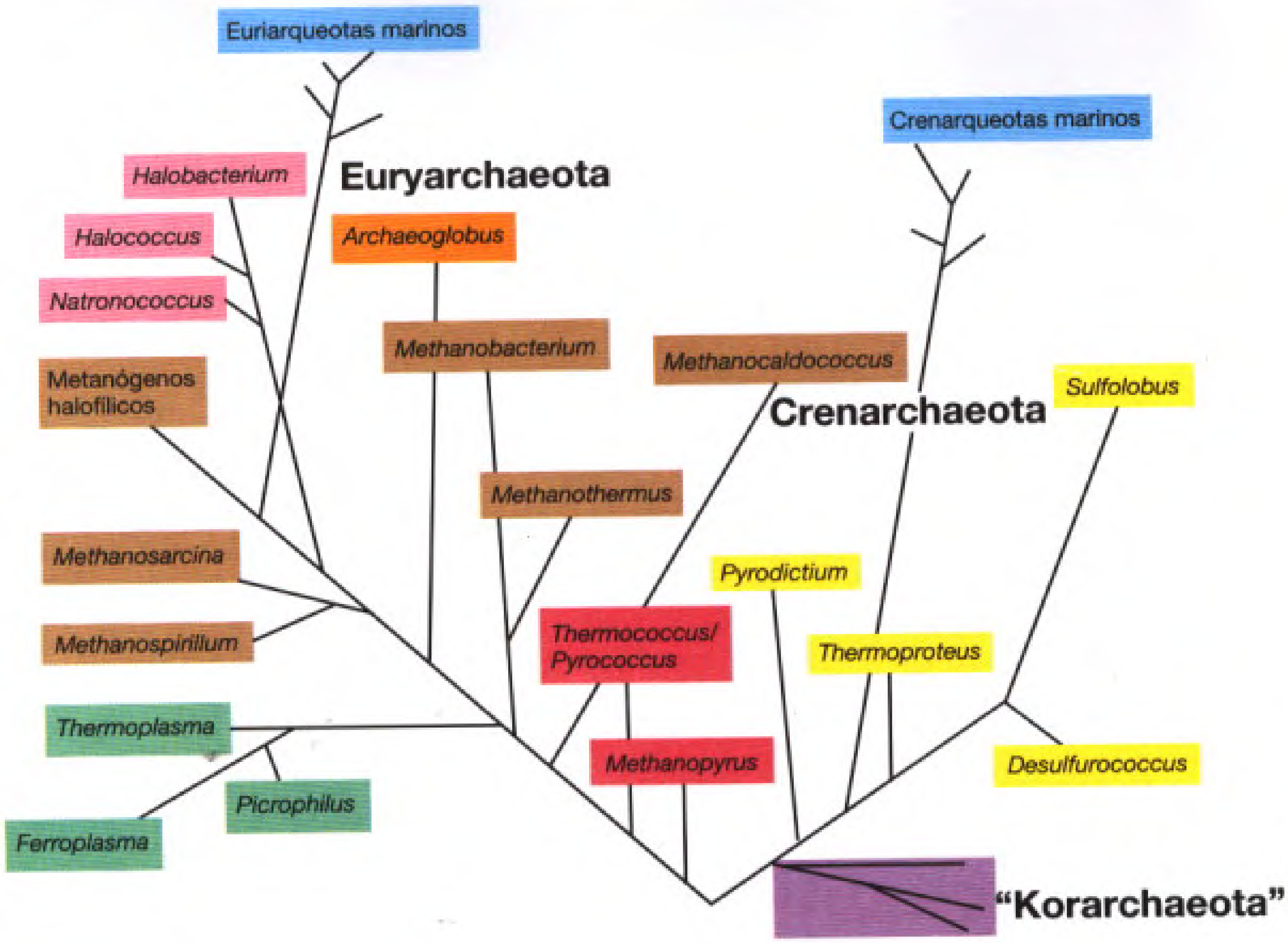
576 B864b.E 10a.ed. c. 18
BROCK, THOMAS D.
Brock. Biología de los microorganis
35604001032976
97668

P.O.G. UTAL
29 NOV. 2004
UTAL-I.M.B.
14 MAR. 2005


Halob
Halococcus
Natronococcu
Metanógenos halofílicos
Methanosarcin
Methanospirill
Thermoplasma
Ferroplasma
os
lobus
ccus
Korarchaeota"

ÁRBOL FILOGENÉTICO DE *ARCHAEA*. Este árbol se ha construido a partir de las secuencias del RNA ribosómico 16S. En *Archaea* pueden definirse tres phyla principales: el phylum Crenarchaeota, formado por especies hipertermófilas y especies que viven en ambientes fríos; el phylum Euryarchaeota, formado por procariotas metanogénicos y halófilos extremos; y el phylum «Korarchaeota», que son hipertermófilos, hasta donde sabemos. *Véanse* Secciones 11.4-11.8 para más información sobre filogenias basadas en RNA ribosómico. *Datos obtenidos de la Base de Datos del Proyecto de Secuenciación del Ribosoma (Ribosomal Database project).* **http://rdp.cme.msu.edu**

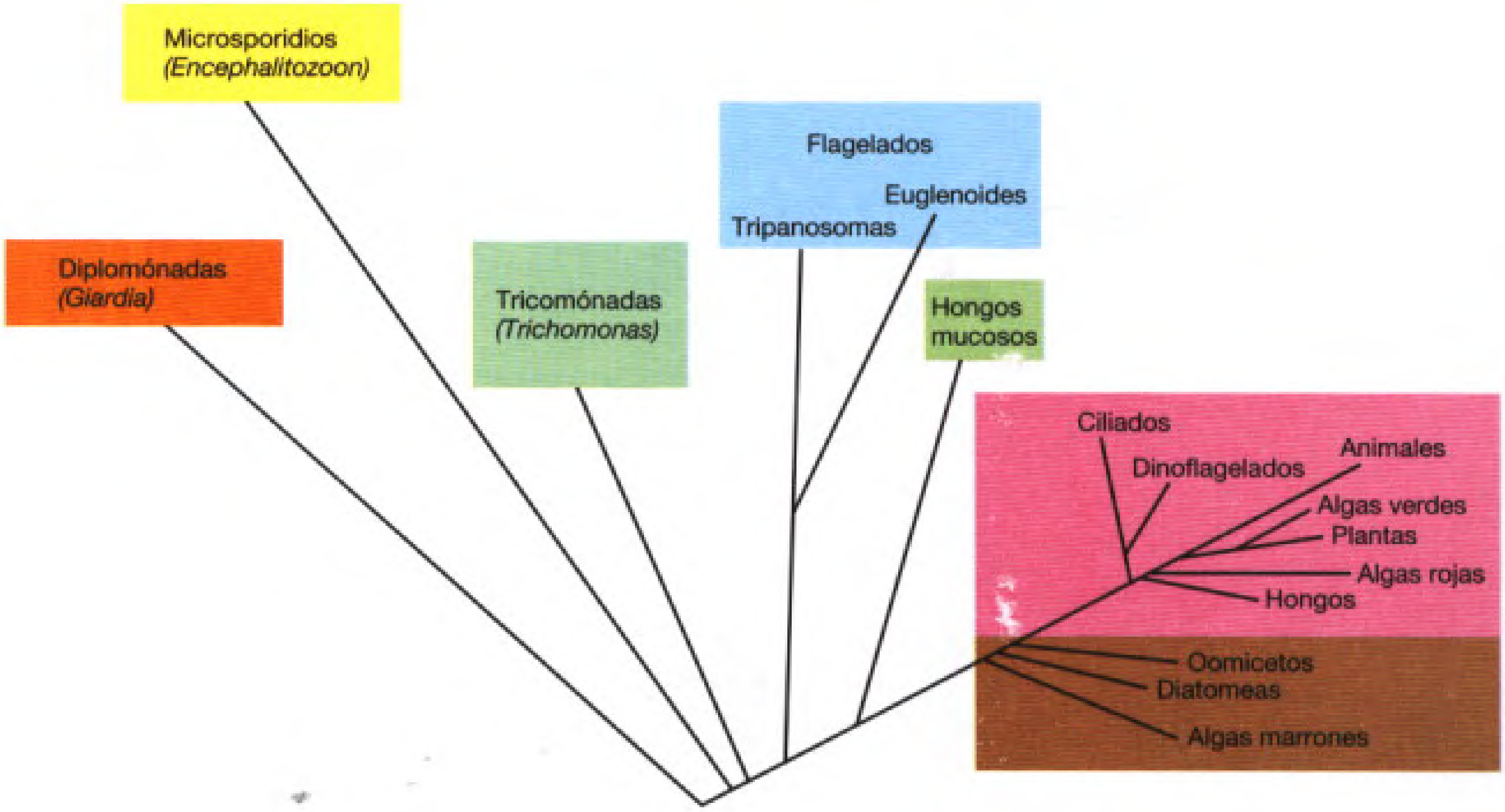
FILO EA


Euriarqueotas marinos
Euryarchaeota
Halobacterium
Halococcus
Natronococcus
Archaeoglobus
Methanobacterium
Metanógenos halofílicos
Methanocaldococcus
Crenarqueotas marinos
Crenarchaeota
Sulfolobus
Methanothermus
Methanosarcina
Pyrodictium
Methanospirillum
Thermococcus/ Pyrococcus
Thermoproteus
Thermoplasma
Methanopyrus
Desulfurococcus
Picrophilus
Ferroplasma
"Korarchaeota"

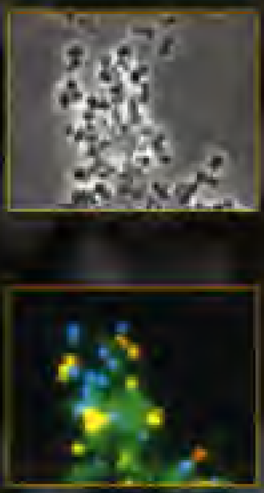
ÁRBOL FILOGENÉTICO DE *ARCHAEA*. Este árbol se ha construido a partir de las secuencias del RNA ribosómico 16S. En *Archaea* pueden definirse tres phyla principales: el phylum Crenarchaeota, formado por especies hipertermófilas y especies que viven en ambientes fríos; el phylum Euryarchaeota, formado por procariotas metanogénicos y halófilos extremos; y el phylum «Korarchaeota», que son hipertermófilos, hasta donde sabemos. *Véanse* Secciones 11.4-11.8 para más información sobre filogenias basadas en RNA ribosómico. *Datos obtenidos de la Base de Datos del Proyecto de Secuenciación del Ribosoma (Ribosomal Database project).*
http://rdp.cme.msu.edu

FILOGENIA DE LOS SERES VIVOS-*EUKARYA*

576 B864b.E 10a.ed. c. 18
BROCK, THOMAS D.
Brock. Biología de los microorganis
35604001032976
97668


Microsporidios
(Encephalitozoon)
Diplomónadas
(Giardia)
Tricomónadas
(Trichomonas)
Flagelados
Euglenoides
Tripanosomas
Hongos mucosos
Ciliados
Dinoflagelados
Animales
Algas verdes
Plantas
Algas rojas
Hongos
Oomicetos
Diatomeas
Algas marrones

ÁRBOL FILOGENÉTICO DE *EUKARIA*, LOS EUCARIOTAS. Este árbol se ha construido a partir de las secuencias del RNA ribosómico 18S, obtenido de la subunidad pequeña de los ribosomas citoplasmáticos. Observe la estecha relación filogenética que existe entre animales y plantas y la distante relación que hay entre estos organismos y otros organismos como *Giardia*. *Véanse* Secciones 11.4-11.8 para más información sobre filogenias basadas en RNA ribosómico. *Datos obtenidos de la Base de Datos del Proyecto de Secuenciación del Ribosoma (Ribosomal Database project).* **http://rdp.cme.msu.edu**



10ª Edición

Brock Biología de los Microorganismos

Madigan • Martinko • Parker

UNIVERSIDAD DE TALCA
BIBLIOTECA CENTRAL
3 5604 00103297 6

En microbiología, como en la vida en general, las cosas n [illegible] La portada y la parte izquierda de esta contraportada inc [illegible] investigación real. Las dos representan el mismo campo [illegible] bacterianas dentro de una muestra de lodo activado proc [illegible] tratamiento de lodos; las células del panel superior se fot [illegible] pía de contraste de fase (una forma de microscopía de luz), mientras que las del panel inferior se tiñeron y fotografiaron mediante microscopía de fluorescencia. Los tintes fluorescentes que se utilizaron para teñir las células, se ligaron a sondas de ácido nucleico diseñadas para lograr la hibridación a las secuencias de ácido nucleico complementarias del RNA de los ribosomas de las células. En todo caso, cada uno de los tintes (verde, azul y amarillo) se ligó a su única sonda propia, lo que permitió que cada una de dichas sondas (de color distinto) se dirigiera a un subconjunto concreto de células dentro de la comunidad microbiana. Tal como se muestra en la micrografía fluorescente, la sonda verde marcó una pequeña bacteria que formaba segmentos celulares, mientras que las sondas azul y amarilla revelaron que las grandes células ovoides, que prácticamente no podían distinguirse en la microscopía de contraste, estaban formadas en realidad por dos poblaciones genéticamente distintas. El uso de este conjunto de sondas en las investigaciones permitió concluir que en la degradación del lodo participaban al menos tres poblaciones distintas.

Las sondas moleculares como las que se muestran aquí han abierto nuevas puertas en el campo de la ecología microbiana, por lo que los microbiólogos, si bien siguen utilizando su herramienta más antigua, el microscopio, disponen ahora de nuevas y apasionantes formas de plantear preguntas sofisticadas sobre la composición de las comunidades naturales de microorganismos.

La décima edición de *Brock Biología de los Microorganismos* trata éstos y otros muchos descubrimientos de la ecología microbiana, así como los principios básicos de la microbiología, la biología molecular, la diversidad microbiana, la genómica y la microbiología médica, todo ello en un lenguaje ameno y comprensible. La décima edición incluye además una presentación y una organización totalmente nuevas del material incluido en la edición anterior de este manual. Así, el libro está ahora organizado en seis unidades temáticas, de modo que los profesores de cursos de introducción a la microbiología podrán tratar los principios fundamentales (Unidad 1) para, a continuación, configurar el resto del curso alrededor de las unidades o capítulos que estimen convenientes. Este nuevo método para la enseñanza de la microbiología mantiene lo mejor de las ediciones anteriores de este manual, con un formato pedagógico flexible adecuado para el nuevo milenio.

LibroSite es una página web, en *castellano*, propia del libro que ofrece un respaldo académico exhaustivo, tanto para los docentes como para los alumnos. Los *profesores* pueden encontrar respuestas a los ejercicios, material adicional, sala de profesores, área de investigación, contribuciones, etc. Para los *estudiantes* existen ejercicios adicionales, enlaces a recursos de Internet sobre el tema, buscadores de trabajo, sala de estudio y mucho más

www.librosite.net/brock

PEARSON
Educación
www.pearsoneducacion.com

ISBN 84-205-3679-2
9 788420 536798